



## **Influência das espécies reativas de oxigênio durante o cultivo *in vitro* de oócitos e folículos ovarianos de mamíferos domésticos**

*Influence of reactive oxygen species during in vitro culture of ovarian oocytes and follicles of domestic mammals*

**Francisco das Chagas Costa<sup>1</sup>, Erlândia Márcia Vasconcelos<sup>1</sup>, José Roberto Viana Silva<sup>1</sup>, Ana Liza Paz Souza Batista<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia da Reprodução – LABIREP – Núcleo de Biotecnologia de Sobral – NUBIS - Universidade Federal do Ceará, Sobral, CE, Brasil

\*Ana Liza Paz Souza Batista, Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral, Av. Comandante Maurocélvio Rocha Ponte, 100, CEP 62042-280, Sobral, CE, Brasil

### **Resumo**

Sistemas de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais e de complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) se tornaram uma poderosa ferramenta capaz de subsidiar diversas biotécnicas reprodutivas, bem como possibilitar estudos do efeito de substâncias sobre a dinâmica folicular. No entanto, esses sistemas podem resultar em estresse oxidativo e na diminuição da proteção antioxidante das células, distúrbio associado a altas taxas de morte celular durante o cultivo *in vitro*. Para contornar esses efeitos adversos, a adição de substâncias antioxidantes aos meios de cultivo tem sido proposta. Abrangendo diferentes classes e mecanismos de ação, compostos antioxidantes têm por função interferir no processo de oxidação para inibir ou retardar o dano oxidativo causado pelos radicais livres às biomoléculas. Além de antioxidantes que têm sido rotineiramente utilizados com esse propósito, recentemente, substâncias alternativas de origem natural como extratos vegetais e óleos essenciais têm ganhado destaque. Dessa forma, diante da influência do estresse oxidativo e da importância do uso de antioxidantes no cultivo celular, a presente revisão objetiva abordar os principais mecanismos de síntese e atuação dos radicais livres bem como o papel dos antioxidantes em protocolos de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos e de CCOs de animais domésticos.

**Palavras-chave:** antioxidantes, cultivo *in vitro*, estresse oxidativo, folículos ovarianos.

### **Abstract**

*In vitro* culture systems for preantral follicles and cumulus-oocyte complexes (COCs) have become a powerful tool capable of subsidizing several reproductive biotechniques, as well as enabling studies of the effect of substances on follicular dynamics. However, these systems can favor oxidative stress and decrease the antioxidant protection of cells, a disorder associated with high rates of cell death during *in vitro* culture. To overcome these adverse effects, the addition of antioxidant substances to the culture media has been proposed. Covering different classes and mechanisms of action, these antioxidant compounds have the function of interfering in the oxidation process to inhibit or delay the oxidative damage caused by free radicals to biomolecules. In addition to antioxidants that have been commonly used for this purpose, recently, alternative substances of natural origin such as plant extracts and essential oils have gained prominence. Thus, given the influence of oxidative stress and the importance of using antioxidants in cell culture, this review aims to address the main mechanisms of synthesis and action of free radicals as well as the role of antioxidants in *in vitro* protocols for ovarian follicles and COCs in domestic animals.

**Keywords:** antioxidants, *in vitro* culture, oxidative stress, ovarian follicles.

### **Introdução**

O cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais, bem como do complexo *cumulus*-oócitos (CCOs), emergiu como uma tecnologia com potencial para a produção de oócitos maduros capazes de serem fertilizados *in vitro* (Hirao, 2011; Songsases et al., 2012; Silva et al., 2015). A manutenção da estrutura folicular *in vitro* durante o crescimento em um ambiente controlado pode, ainda, contribuir para a compreensão dos mecanismos que regulam a relação íntima entre oócito, células da granulosa e da teca (Kreeger et al., 2005). Além disso, possibilita monitorar modificações foliculares e ovarianas em resposta

\*Correspondência: analizabatista@gmail.com

Recebido: 15 de outubro de 2021

Aceito: 20 de maio de 2022



a diversos fatores durante o desenvolvimento desses folículos (Guerreiro et al., 2016). No entanto, folículos ovarianos e CCOs cultivados *in vitro* têm menor capacidade de desenvolvimento e maturação do que aqueles crescidos *in vivo* (Magalhães et al., 2011; Zhao et al., 2017; Sá et al., 2018). Dentre as variáveis que podem contribuir para essa menor competência folicular e oocitária, destacam-se a elevada síntese de espécies reativas de oxigênio (EROs) durante o cultivo *in vitro* (Agarwal et al., 2012).

A formação de EROs (espécies reativas de oxigênio) em condições *in vivo* é um processo fisiologicamente importante, ligado ao metabolismo celular cuja síntese é desencadeada, tipicamente, durante a redução de oxigênio no interior da mitocôndria (Li et al., 2017). No entanto, sua produção em excesso pode desencadear o estresse oxidativo (Silva et al., 2011; Sies, 2015; Tsikas, 2017). Ao longo do cultivo *in vitro* o estresse oxidativo está associado a altas taxas de morte folicular, o que compromete severamente a qualidade dos folículos cultivados (Saeed-Zidane et al., 2017). Dentre os muitos efeitos conhecidos dada a formação aumentada de EROs estão a peroxidação de membranas lipídicas, dano oxidativo aos ácidos nucleicos e carboidratos e ainda a oxidação de grupos sulfidrila nas proteínas (Dornas, et al., 2007). Esses eventos resultam em mau funcionamento do DNA, perda da integridade da membrana e disfunção mitocondrial (Wu et al., 2011). Além disso, o estresse oxidativo pode, ainda, ativar importantes vias indutoras de apoptose, além de regular positivamente o nível de expressão de proteínas pró-apoptóticas resultando, dessa forma, no comprometimento da estrutura dos folículos ovarianos cultivados *in vitro* (Hori et al., 2013).

Para contornar os efeitos deletérios inerentes ao estresse oxidativo ocasionado pelos sistemas de cultivo *in vitro*, diferentes estratégias têm sido propostas, como a adição de substâncias antioxidantes aos meios, tais como a glutatona (Yoshihara et al., 2009), melatonina (Tanabe et al., 2015), transferrina, selênio e ácido ascórbico (Luz et al., 2013; Santos et al., 2014). Abrangendo diferentes classes e mecanismos de ação, os antioxidantes têm por função interferir no processo de oxidação com a finalidade de inibir ou retardar o dano oxidativo (Ribeiro et al., 2005; Sousa et al., 2007; Oroian, Escriche, 2015). Além desses antioxidantes que têm sido rotineiramente utilizados no cultivo de folículos ovarianos e CCOs, recentemente, a busca de substâncias alternativas como a rutina (Lins et al., 2017) e o resveratrol (Rocha et al., 2018) tem ganhado destaque, sendo objeto de estudo de muitos pesquisadores (Wang et al., 2014; Kaur e Muthuraman, 2016). Esse crescente interesse na prospecção e caracterização de substâncias de origem natural com atividade antioxidante está relacionado à sua ampla distribuição em diversos tipos de plantas (Budani e Tiboni, 2020) bem como à possibilidade de um único antioxidante natural substituir dois ou mais antioxidantes sintéticos durante o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos mamíferos, o que oferece vantagens em termos de praticidade e custo (Lins et al., 2017).

Outro grupo de compostos que têm sido objeto de estudos são os óleos essenciais obtidos a partir de plantas. Esses compostos são caracterizados por possuírem uma ampla variedade de componentes bioativos, razão pela qual têm atraído interesse no seu uso para diversas finalidades, incluindo ação antioxidante (Carneiro et al., 2017). O alto potencial antioxidante dos óleos essenciais está relacionado à presença de metabólitos secundários como compostos fenólicos e seus derivados os quais estão intimamente relacionados com a eliminação de radicais livres, principalmente devido à presença de grupos hidroxila nas suas estruturas, tornando-os potenciais agentes redutores através da doação de hidrogênios (Aquino et al., 2017; Ghaffari et al., 2018). Além dos óleos essenciais, os extratos vegetais também apresentam importante atividade antioxidante (Chaves et al., 2020). De maneira geral, o efeito antioxidante dos extratos é, assim como nos óleos essenciais, devido à grande diversidade de moléculas de eliminação de radicais livres, como compostos fenólicos, antocianinas, carotenoides e vitaminas (Benabderrahim et al., 2019). Nesse sentido, diversos estudos já demonstraram a efetividade de extratos naturais com propriedades antioxidantes, como: extrato de *Justicia insularis* (Mbemya et al., 2018); extrato de própolis vermelha (Nascimento et al., 2019); e extrato de *Amburana cearensis* (Barberino et al., 2016).

A presente revisão objetiva abordar os principais mecanismos de síntese e atuação dos radicais livres bem como o papel dos antioxidantes em protocolos de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos e de CCOs de fêmeas domésticas.

### **Produção e ações das espécies reativas de oxigênio**

Os radicais livres são espécies químicas constituídas por um átomo ou associação de átomos que apresentam um ou mais elétrons não pareados em sua órbita mais externa, apresentando alta instabilidade energética e cinética (Valko et al., 2007). Quando sua síntese é derivada do oxigênio são denominados de EROs (espécies reativas de oxigênio) e são as mais relevantes, pois sua formação é desencadeada durante

o processo normal da redução de oxigênio no interior da mitocôndria (Silva et al., 2011).

As EROs são normalmente produzidas nas células como resultado do metabolismo celular normal e são fundamentais para a manutenção da homeostase celular (Cenini et al., 2019). Em condições fisiológicas, concentrações baixas a moderadas de EROs estão envolvidas em processos como resposta imune, inflamação, plasticidade sináptica, aprendizado e memória (Kishida e Klann, 2007). Além disso, podem atuar como segundos mensageiros celulares para regular as vias de transdução de sinais que levam ao controle da expressão gênica e às alterações pós-traducionais de proteínas envolvidas no crescimento, diferenciação e morte celular (Allen e Tresine, 2000). No ovário mamífero, as EROs possuem participação importante na proliferação celular (Rahimi et al., 2003), maturação oocitária (Hammadeh et al., 2008), luteólise (Sugino et al., 2000), esteroidogênese folicular e luteal, ovulação, fertilização, implantação e desenvolvimento embrionário inicial (Agarwal e Allamaneni, 2004; Fujii et al., 2005). Portanto, sua produção em proporções adequadas é fisiologicamente importante, porém, a produção excessiva pode conduzir a danos oxidativos (Filipovic et al., 2015). Por esse motivo, em condições fisiológicas, as EROs e os sistemas antioxidantes naturais encontram-se em uma situação de equilíbrio. Quando este equilíbrio é quebrado e uma quantidade excessiva de EROs é produzida e liberada sem a correspondente degradação pelos agentes antioxidantes ocorre o estresse oxidativo (Andrade et al., 2010).

Nas células, a perda do equilíbrio redox pode ser desencadeada por espécies reativas oriundas das mais diversas fontes (Fig.1) e podem, didaticamente, ser divididas em duas categorias: espécies radicalares e não radicalares (Tab.1). As espécies radicalares são caracterizadas pela capacidade de atuarem como doadoras ou aceptoras de elétrons criando alterações no ambiente molecular ao seu redor. Já as espécies não radicalares não possuem elétrons livres, mas também podem reagir com moléculas ao seu redor ocasionando os mais variados efeitos adversos (Barreiros et al., 2006; Tortora et al., 2012; Martelli e Nunes, 2014).

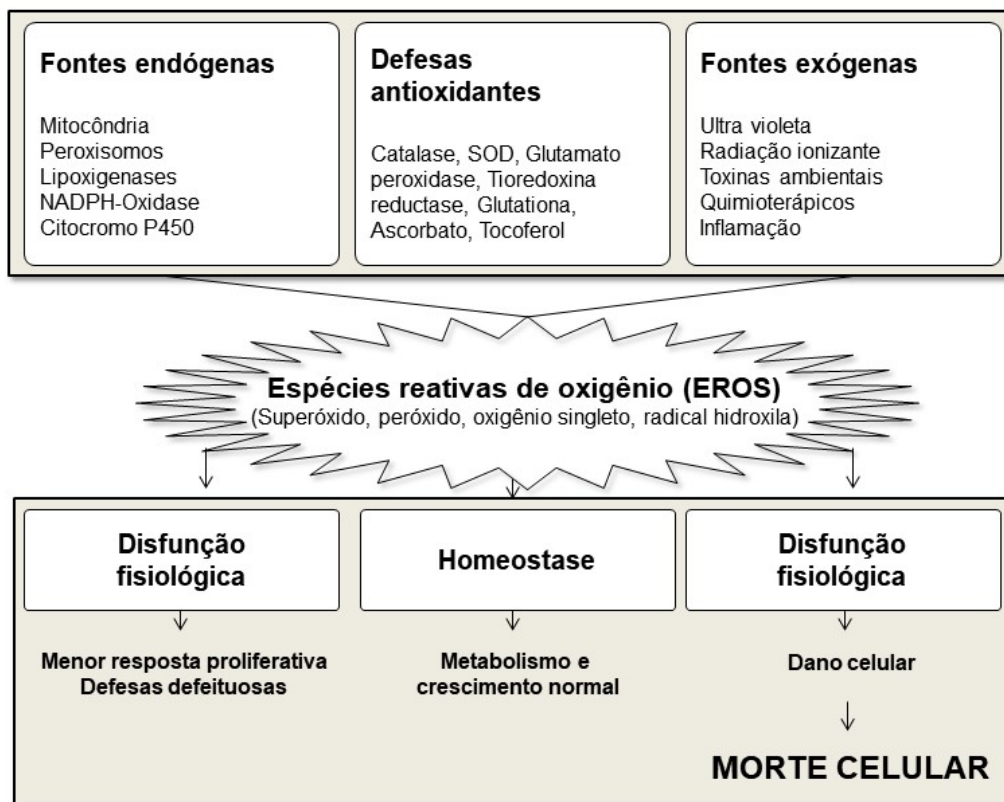


Figura 1. As espécies reativas de oxigênio são moléculas oxidadas altamente reativas que são constantemente produzidas em condições celulares normais, como durante a homeostase ou de forma exacerbada, que pode levar a danos celulares diversos. (Adaptado de Lin et al., 2016).



Tabela 1. Principais espécies reativas de oxigênio

EROs	Estrutura química	Descrição	Ocorrência
<b><i>Espécies Radicalares</i></b>			
Hidroxila	HO	Altamente reativo	Formado a partir da hemólise da água
Radical superóxido	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Altamente potente na indução de dano celular	Praticamente em todas as células aeróbicas
Peroxila	ROO <sup>•</sup>	Agente importante na oxidação do DNA e lipídios	Formado a partir da oxidação não enzimática de lipídios
Alcoxila	RO <sup>•</sup>	Envolvidos em muitas reações em cadeia, incluindo a peroxidação lipídica	Pode ser formado a partir da conversão de hidroperóxidos lipídicos (ROOH)
<b><i>Espécies Não-radicalares</i></b>			
Oxigênio Singlete	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Molécula excitada de oxigênio. Não é um radical livre por não possuir elétrons desemparelhados na última camada	Produzido por fagócitos, indução luminosa e reações catalisadas pelas peroxidases
Peróxido de hidrogênio	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Não é um radical livre por não apresentar elétrons desemparelhados na última camada	Reações para produção de HO <sup>•</sup>
Ácido hipocloroso	HClO	Molécula altamente tóxica que reage com biomoléculas essenciais causando danos oxidativos, incluindo peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas	Sintetizado por mieloperoxidases nos neutrófilos a partir de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e cloreto

Fonte: Oliveira; Schoffen (2010) e Goemans; Collet (2019).

A nível celular, os efeitos de espécies reativas podem variar desde a morte celular devido a danos generalizados a macromoléculas como DNA, proteínas e carboidratos, bem como alterações na homeostase iônica intracelular e lipoperoxidação até efeitos mais sutis no metabolismo celular, morfologia ou vias de sinalização (Martindale e Holbrook, 2002; Wang, et al., 2019). O impacto global das EROs na função celular varia com as espécies reativas, mas também pode ser afetado pelo tipo de célula, níveis de antioxidantes endógenos, enzimas antioxidantes, estado de diferenciação bem como o ambiente extracelular (Jones e Go, 2010).

#### *Dano oxidativo ao DNA*

As EROs são uma das principais fontes de dano ao DNA (Cooke et al., 2003). Entre as nucleobases, a guanina é a mais susceptível às EROs devido ao seu baixo potencial redox, e os principais produtos de sua oxidação são a 8-hidroxiguanina e a 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OHG e 8-OHdG), ambas são altamente mutagênicas e carcinogênicas, pois podem combinar tanto com a citosina quanto com a adenina, levando, assim, à transições de GC para AT (Neelet e Essigmann, 2006). É importante ressaltar que diferentes produtos de oxidação no DNA podem resultar em diferentes tipos de mutações gênicas, com a ressalva de que a ocorrência da mutação depende da especificidade da eficiência do reparo do gene alvo (Jiang e James, 2019).



O DNA mitocondrial (mtDNA) é particularmente vulnerável ao ataque de EROs devido à geração delas na cadeia transportadora de elétrons (CTE), bem como à falta de proteção das histonas e a ausência ou mecanismos mínimos de reparo (Cooke et al., 2003). A CTE produz radicais livres do oxigênio durante o seu funcionamento normal e eles desempenham um papel importante na sinalização celular (Dunn et al., 2015). No entanto, a extensão de EROs produzida pode aumentar durante o mau funcionamento da CTE. Um pequeno desequilíbrio nas funções da CTE pode levar a um acúmulo transitório de EROs, o que pode danificar o mtDNA nos genes que codificam os componentes da CTE. A expressão desses genes danificados pode levar à síntese de proteínas da CTE com problemas, maior acúmulo de EROs e ainda mais danos maciços ao mtDNA em uma situação referida como “ciclo vicioso mitocondrial” (Pinto e Moraes, 2015).

#### *Homeostase iônica intracelular*

Ainda como efeito deletério de EROs pode ocorrer perda da homeostase iônica intracelular por perturbações em canais iônicos causadas pelo acúmulo de radicais livres na célula. As EROs podem induzir diretamente modificações pós-traducionais desses canais iônicos levando à oxidação de resíduos de aminoácidos específicos (grupos sulfidríla ou ligações dissulfeto envolvendo resíduos de cisteína) ou indiretamente modular a função do canal afetando as vias de sinalização que controlam a transcrição gênica (Annunziato et al., 2002).

No retículo endoplasmático (RE), o desequilíbrio de EROs pode induzir a liberação de  $Ca^{2+}$  levando à perda da homeostase desse íon na célula, já que EROs são capazes de ativar canais de liberação de  $Ca^{2+}$  na membrana do retículo (Hool e Corry, 2007). A liberação resultante de  $Ca^{2+}$  do RE ativa diversos processos sensíveis ao cálcio dentro da célula incluindo importantes vias de sinalização (Hool e Corry, 2007). Além disso, a perda da atividade das chaperonas resulta no acúmulo de proteínas mal dobradas dentro do lúmen, levando à geração adicional de EROs, na tentativa de redobrá-las (Tu e Weissman, 2004). O acúmulo também estimulará a resposta a proteínas mal enoveladas, um conjunto altamente conservado de vias de sinalização que visam restaurar a homeostase, mas, se isso falhar, estimulará a apoptose (Xu et al., 2005; Ron e Walter, 2007).

O aumento na concentração do íon  $Ca^{2+}$  citosólico também afeta negativamente a função mitocondrial, incluindo um aumento na produção própria de EROs e a abertura do poro de transição de permeabilidade. Essa abertura é promovida sinergicamente pelo aumento de  $Ca^{2+}$  e oxidação dos grupos tiol nas proteínas da membrana mitocondrial interna (Kowaltowski et al., 2001). Como resultado, o potencial de membrana mitocondrial e a síntese de ATP colapsam. Se as mitocôndrias em toda a célula forem afetadas, as concentrações de ATP caem abruptamente, a homeostase iônica é perdida, causando a morte da célula (Burton e Jauniaux, 2011).

#### *Peroxidação lipídica*

A peroxidação lipídica corresponde a uma sequência de reações químicas resultantes da interação de ácidos graxos insaturados com oxigênio (Abuja e Albertini, 2001). Esse processo ocorre nas cadeias laterais dos ácidos graxos poli-insaturados da membrana plasmática ou de qualquer organela que contenha lipídios e pode ser dividido em três etapas: iniciação, propagação e terminação (Wang et al., 2017) conforme sinteticamente esquematizado na Fig.2.

Na célula, a lipoperoxidação acarreta severas alterações na estrutura e permeabilidade da membrana celular, alterando o fluxo de íons e resultando na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas na célula (Ayala; Muñoz e Arguelles, 2014). Além disso, a peroxidação lipídica gera um grupo heterogêneo de produtos finais relativamente estáveis, como malondialdeído (MDA), 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), acroleína e isoprostanos (Reed, 2011). MDA, HNE e acroleína são capazes de ligar proteínas e DNA, levando à alteração da conformação e função (Winczura et al., 2012).

#### *Oxidação de proteínas e carboidratos*

As proteínas também são expostas a ataques de EROs, ocasionando modificações de aminoácidos sítio-específicos, fragmentação da cadeia peptídica, agregação de produtos de reação reticulados, carga elétrica alterada e aumento da suscetibilidade das proteínas à proteólise (Moller e Kristensen, 2004). Nas enzimas, as alterações no nível de aminoácidos tendem a resultar em alterações de

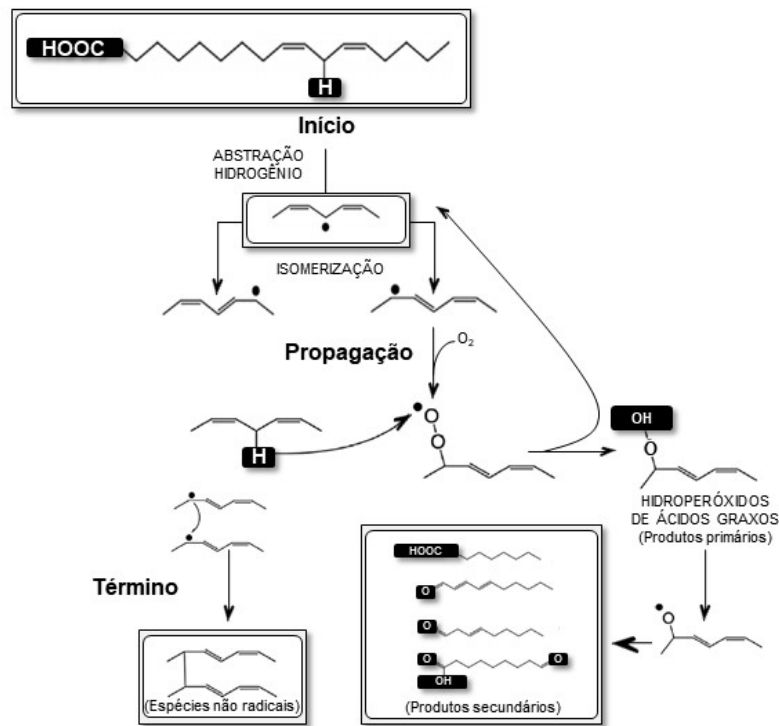


Figura 2. Esquema simplificado da peroxidação lipídica (Adaptado de Wang *et al.*, 2017).

estrutura e, conseqüentemente, da função enzimática. Isto leva a alterações funcionais que perturbam o metabolismo celular (Kada *et al.*, 2017).

Os carboidratos também podem ser afetados por EROs, onde a oxidação de açúcares gera compostos dicarbonílicos intermediários altamente reativos, como na glicólise e na auto-oxidação da glicose, gerando o metilglicoxal e o glioxal. Esses produtos possuem grupos carbonílicos reativos que se condensam aos grupos de amina primárias e geram os produtos finais de glicação avançada (AGEs) (Cenini *et al.*, 2005; Vistoli *et al.*, 2013). Os mecanismos básicos pelos quais os AGEs danificam as células compreendem a modificação de estruturas intracelulares, incluindo as que participam da transcrição gênica; interações com proteínas da matriz extracelular. Isto muda a sinalização entre a matriz e a célula e gera falhas nas funções e na estrutura do tecido afetado. Além disso, pode ocorrer modificação de proteínas ou lipídeos plasmáticos (Brownlee, 2005).

Como visto, as EROs correspondem a um importante fator capaz de limitar e/ou impossibilitar a manutenção da viabilidade de células sob condições de estresse oxidativo. Dito isso, verifica-se a necessidade de uma explanação mais específica acerca da influência desse estresse em sistemas de cultivo *in vitro* de oócitos e foliculos ovarianos.

### Influência do estresse oxidativo no cultivo *in vitro* de oócitos e foliculos ovarianos

O sucesso do cultivo *in vitro* envolve a adição de diversas substâncias visando oferecer um ambiente mais próximo do que seria *in vivo*. No entanto, fatores como a procedência dos ovários, suplementação dos meios de cultivo e o estresse oxidativo, influenciam o sucesso da foliculogênese *in vitro* (Silva *et al.*, 2015; Sá *et al.*, 2018). O estresse oxidativo pode provocar danos à fisiologia folicular e desencadear várias vias de morte celular no ovário. Tanto o oócito quanto as células da granulosa podem sofrer apoptose, autofagia e necrose em decorrência do estresse oxidativo (Chaudhary *et al.*, 2019).

O cultivo *in vitro* do tecido ovariano (*in situ*) apresenta inúmeras vantagens, uma vez que os foliculos presentes podem ser mantidos no ambiente natural. No entanto, o sucesso dos atuais sistemas de cultivo ainda é insatisfatório, sendo limitado por uma baixa eficiência de sobrevivência de foliculos primordiais e primários em longo prazo. (Chandra *et al.*, 2000; Guzel e Oktem, 2017). Por exemplo, Yin *et al.* (2016) observaram sobrevivência de apenas 38% de foliculos primordiais/primários ao final de 7 dias de cultivo *in vitro*. Um dos fatores que pode influenciar no sucesso do cultivo *in vitro* é o estresse



oxidativo visto que, de acordo com Massignam et al. (2018), qualquer manipulação de tecidos e células pode levar à produção excessiva de EROs, provocando danos celulares, teciduais e, eventualmente, morte celular. De fato, o cultivo *in situ* ocasiona uma maior formação de espécies reativas, havendo assim a necessidade de se utilizar substâncias antioxidantes que promovam um equilíbrio na produção de EROs (Silva et al., 2011). Um dano importante causado pelo estresse oxidativo é a quebra do DNA no momento da replicação, prejudicando a polimerização do DNA, resultando em degeneração, morte celular e consequentemente em danos teciduais (Cox et al., 2000).

O cultivo *in vitro* de folículos ovarianos isolados também sofre ação negativa do estresse oxidativo, que é ocasionado pela manipulação, cessação da proteção antioxidante sistêmica em virtude do isolamento folicular do ambiente fisiológico e pelo aumento dos níveis de oxigênio no meio celular, promovendo assim uma baixa produção de oócitos competentes para etapas subsequentes, como a fertilização *in vitro* (Sá et al., 2018). Folículos ovarianos cultivados *in vitro* apresentam menor capacidade de desenvolvimento quando comparados aos crescidos no ambiente fisiológico. Isso porque, em condições *in vitro*, os folículos são normalmente expostos a concentrações de oxigênio superiores às fisiológicas (20%) (Sá et al., 2018). Além disso, a produção de subprodutos da peroxidação lipídica como o malondialdeído (MDA) pode, ainda, provocar reações destes com outros componentes celulares, incluindo proteínas, ácidos nucleicos e levar à disfunção da célula (Halliwell, 2014; Kashka et al., 2016).

O estresse oxidativo também provoca danos às células da granulosa, que podem apresentar crescimento anormal e perda da função, levando essas células à apoptose, e, por conseguinte, à atresia folicular (Lee et al., 2013; Li et al., 2016; Zhang et al., 2016). As mitocôndrias são as primeiras organelas a sofrerem degeneração, pois são o local de produção dos radicais de oxigênio. Assim, o dano provocado a essas organelas pelas EROs leva à degeneração das células da granulosa e a uma diminuição na qualidade dos folículos ovarianos *in vitro* (Shi et al., 2016). Estudos demonstraram que a apoptose induzida pelo estresse oxidativo em células da granulosa resulta na redução dos níveis de estradiol e em atresia folicular (Ghatebi et al., 2019). Foi observado que, o estresse oxidativo, é capaz de interromper a comunicação entre oócitos e células da granulosa promovendo uma diminuição da qualidade oocitária (Chaube et al., 2014). Evidências apontam ainda que as EROs são capazes de induzir várias vias de apoptose mitocondrial através da ativação de receptores de morte localizados nas membranas celulares, ocorrendo assim, a indução da proteína quinase ativadora de mitógenos e da via das caspases (Chandra et al., 2000).

O estresse oxidativo é o responsável primário pelo declínio da qualidade dos oócitos em função da idade, através da acumulação de danos causados às mitocôndrias durante o metabolismo biológico diário (Bentov et al., 2011). Assim, distúrbios na função mitocondrial e outros fatores como o estresse do retículo endoplasmático e redução da capacidade antioxidante podem estar envolvidos na progressão do envelhecimento oocitário (Zhang et al., 2019). Além disso, sob condições de maturação *in vitro*, oócitos podem ser facilmente perturbados pelo acúmulo de EROs, uma vez que o estresse oxidativo decorrente pode afetar negativamente a integridade do fuso meiótico. Isto compromete sua função biológica (Sharma et al., 2013) e diminui as taxas de retomada meiótica (Salavati et al., 2012; Zhao et al., 2017).

É importante ressaltar que em condições normais, as espécies reativas de oxigênio desempenham funções essenciais para o desenvolvimento do oócito e para o processo de ovulação (Rizzo et al., 2012). De acordo com Chaudhary et al. (2019), níveis moderados de EROs, desencadeiam a retomada meiótica do oócito da fase de diplóteno, bem como a parada em metáfase II. A suplementação do meio com antioxidantes inibe a retomada espontânea da meiose durante o cultivo *in vitro*. Assim, apesar das EROs serem um produto normal do metabolismo celular, o seu excesso provoca danos ao DNA, disfunção mitocondrial e modificação da oxidação de proteínas, isso resulta em baixa qualidade de oócitos e bloqueio do seu potencial de desenvolvimento (Tamura et al., 2008; Rajani et al., 2012). Dado isso, a suplementação dos meios com substâncias antioxidantes, é etapa fundamental em protocolos dessa natureza, com o propósito de minimizar os danos advindos do estresse oxidativo.

### **Antioxidantes utilizados no cultivo *in vitro* de oócitos e folículos ovarianos**

A composição dos meios de cultivo de folículos ovarianos é um fator chave para promover o adequado desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais (Ferreira et al., 2016). Um ambiente equilibrado de oxigênio deve ser considerado, devido ao efeito danoso do estresse oxidativo. Dessa forma, embora certa concentração de EROs seja necessária para que várias vias metabólicas funcionem, é importante a manutenção de um equilíbrio na produção desses compostos, tendo em vista seus efeitos deletérios sobre células da granulosa, fertilização oocitária e desenvolvimento embrionário inicial



(Agarwall e Allamaneni, 2004; Bedaiwy et al., 2004). Portanto, a adição de antioxidantes ao meio de cultivo é necessária para prevenir ou diminuir o dano induzido pelo estresse oxidativo *in vitro* e, por esse motivo, diferentes componentes antioxidantes têm sido rotineiramente adicionados em meios de cultivo de células e tecidos ovarianos. A utilização de antioxidantes como transferrina, selênio e ácido ascórbico (Luz et al., 2013; Santos et al., 2014) já é bastante difundida e apresenta resultados satisfatórios. No entanto, eles não suprem com total efetividade as necessidades antioxidantes observadas nesses sistemas. Por esse motivo, fica evidente a necessidade da realização de estudos que objetivem a prospecção e caracterização de compostos alternativos, principalmente aqueles de origem natural, que possuam eficácia na manutenção do equilíbrio redox.

#### *Antioxidantes de origem vegetal e seus efeitos no cultivo in vitro de oócitos e foliculos ovarianos*

A utilização de compostos naturais presentes em plantas medicinais tem sido considerada uma estratégia promissora na busca por fontes alternativas de suplementos com atividade antioxidante (Barberino et al., 2015). Nesse contexto, os extratos vegetais têm ganhado destaque por possuírem uma grande variedade de moléculas sequestradoras de radicais livres, como flavonoides, antocianinas, carotenoides, glutatiónina, vitaminas e metabólitos endógenos (Maia, 2008). Essas características ampliam o interesse na utilização dessas substâncias como potenciais inibidores do estresse oxidativo no cultivo *in vitro* de foliculos ovarianos e oócitos em animais domésticos. Além dos extratos, os óleos essenciais também têm atraído o interesse no seu uso para diversas finalidades, incluindo proteção antioxidante (Carneiro et al., 2017). Entre os componentes químicos encontrados nessas substâncias, podem-se citar os monoterpenos, triterpenos e sesquiterpenos sendo os monoterpenos seus componentes mais comuns (Fig. 3). (Morais et al., 2006; Ghaffari et al., 2018) e, assim como os extratos, os óleos essenciais possuem um importante teor de compostos fenólicos e derivados (Aquino et al., 2017). Essas características sugerem o potencial da utilização desses compostos como suplementos com propriedade antioxidante na otimização de sistemas de cultivo *in vitro* de foliculos ovarianos.

Dentre os metabólitos potencialmente antioxidantes presentes nos extratos e óleos essenciais vegetais, os compostos fenólicos (Fig. 4), representados, principalmente, pelos flavonoides e taninos, (Aquino et al., 2017) têm sido bastante difundidos. Os flavonoides compõem uma classe de componentes químicos que diferem entre si pela estrutura química, e apresentam diversas formas de ação antioxidante, dada a sua capacidade em neutralizar os radicais livres ou quelar íons metálicos (Aquino et al., 2017). A presença de grupos hidroxilas em sua estrutura promove a inibição das reações de oxidação das espécies reativas de oxigênio por doarem átomos de hidrogênio às espécies, estabilizando-as e transformando-as em quinonas (substâncias pardas) (Ghaffari et al., 2018). Por sua vez, ao quelar íons metálicos, ocorre a inibição da reação de Fenton, uma forma endógena de produzir espécies reativas (Aquino et al., 2017). Além disso, os flavonoides podem atuar como inibidores do sistema enzimático que é responsável pela formação de EROs a partir de enzimas como cicloxigenase e lipoxigenase. Eles podem atuar ainda por meio da indução de enzimas com propriedades antioxidantes, como a metalotioneína, que é capaz de quelar metais (Behling et al., 2006).

Nesse contexto, em estudo recente conduzido por Lins et al. (2017) verificou-se que a rutina, pertencente ao grupo dos flavonoides, foi capaz de aumentar a proteção antioxidante de foliculos ovarianos ovinos cultivados por 12 dias pelo aumento nos níveis de GSH. Nesse estudo foi proposto que a rutina pode ser utilizada como único antioxidante presente no meio base, substituindo a adição de transferrina, selênio e ácido ascórbico durante o cultivo *in vitro* de foliculos secundários ovinos por 12 dias. Em outro estudo, o resveratrol foi capaz de proteger a função mitocondrial pela ativação do gene da sirtuína-1 (SIRT1), encontrado nas células da granulosa, células do *cumulus*, oócitos e blastocistos (Morita et al., 2012; Wang et al., 2014). Em estudo de Rocha et al. (2018), demonstrou-se que o resveratrol foi capaz de manter parâmetros aceitáveis de EROs em tecido ovariano de bovinos. Somado a isso, já foi verificado que antocianinas, obtidas a partir de maçãs vermelhas, foram capazes de reduzir o estresse oxidativo em células da granulosa de suínos com importante repercussão no aumento da expressão de proteínas antiapoptóticas Bcl2, além da redução da proteína pro-apoptótica Bax (Xiang et al., 2017). Além desses relatos, Gouveia et al. (2016) verificaram que a suplementação do meio base com extrato de *Amburana cearensis* associado ao FSH foi capaz de melhorar os níveis de GSH e mitocôndrias metabolicamente ativas em foliculos caprinos cultivados *in vitro*, corroborando com achados de Barberino et al. (2015) que constataram que uma concentração adequada do extrato de *A. cearensis*, sem suplementação, mantém a sobrevivência folicular e promove o desenvolvimento de foliculos secundários isolados de ovinos *in vitro*.



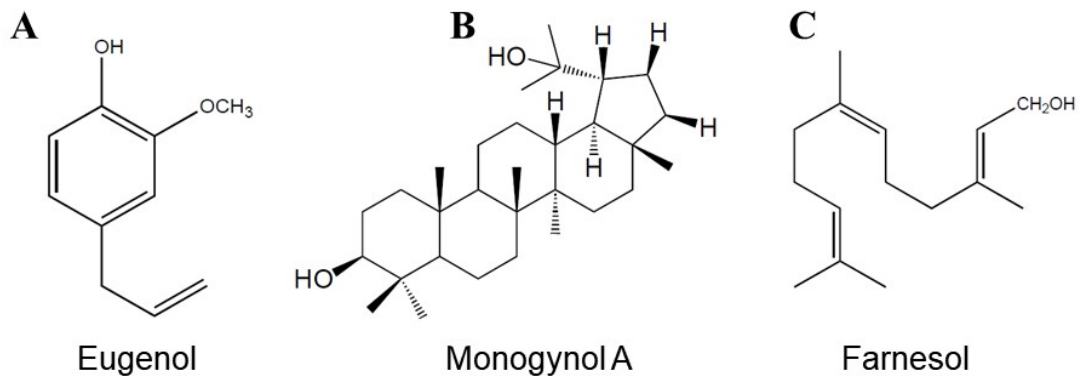


Figura 3. Estrutura química de alguns terpenos com atividade antioxidante demonstrada. (A) Eugenol (monoterpeno); (B) Monoginol A (triterpeno) e (C) Farnesol (sesquiterpeno).

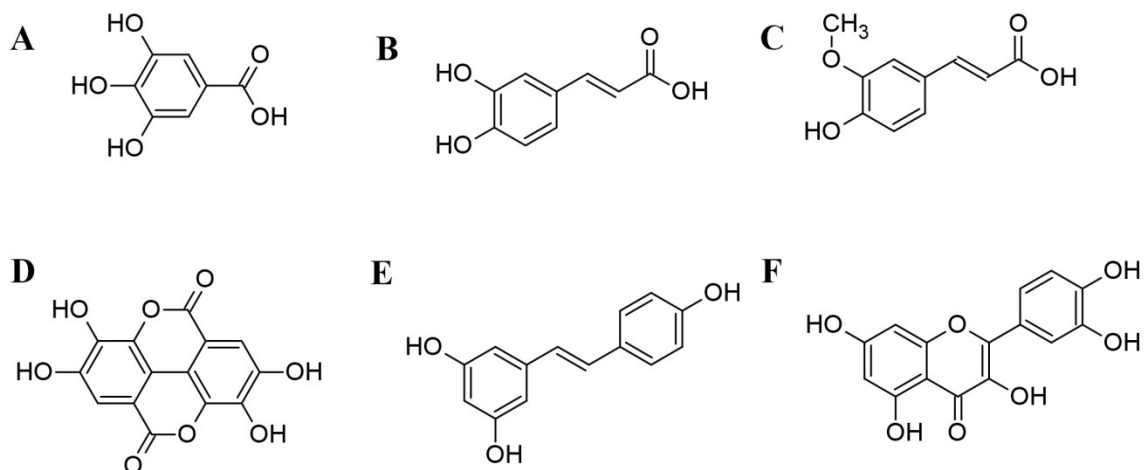


Figura 4. Compostos fenólicos comuns nas plantas compreendendo um anel aromático, com um ou mais substituintes hidroxila variando de compostos fenólicos simples à moléculas com alto grau de polimerização. Ácido gálico (A); ácido cafeico (B); ácido ferúlico (C); ácido elágico (D); resveratrol (E) e quercetina (F).

### Considerações finais

A síntese de espécies reativas de oxigênio decorrente de procedimentos de cultivo *in vitro* de oócitos e folículos ovarianos tem impactado negativamente na eficiência desta biotecnologia. No entanto, o excesso de EROs durante o período do cultivo pode ser controlado através da utilização de compostos com atividade antioxidante capazes de modular positivamente os compartimentos celulares e estabelecendo proteção contra o estresse oxidativo. Por isso, a ampliação de conhecimentos acerca da influência do estresse oxidativo, bem como sobre os benefícios proporcionados pela adição de antioxidantes sobre a viabilidade de oócitos e folículos ovarianos *in vitro* é de extrema importância para o direcionamento de trabalhos futuros que visem ao desenvolvimento de protocolos alternativos de cultivo *in vitro*. É nesse sentido que avultam em importância estudos que promovam a prospecção e caracterização de substâncias de origem vegetal com atividade antioxidante, a exemplo dos extratos e óleos essenciais. De fato, esses compostos têm sido apontados como eficientes e, com isso, surgem como estratégia bastante promissora na atenuação do desequilíbrio redox de gametas femininos submetidos a cultivo *in vitro*.



## Agradecimentos

À Fundação Cearense de Apoio do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro; à Universidade Federal do Ceará (UFC) e a todos que compõem o Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia da Reprodução (LABIREP) pelo apoio.

## Referências

- Abuja PM, Albertini R.** Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin Chim ACTA*, v.306, n.1-2, p.1-17, 2001.
- Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S.** The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol*, v.10, n.49, p. 1-30, 2012.
- Agarwal A, Allamaneni SSR.** Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. *Reprod Biomed Online*, v.9, n.3, p.338-347, 2004.
- Allen RG, Tresini M.** Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med*. v.28, p.463-99, 2000.
- Andrade ER, Melo-Sterza FA, Seneda MM, Alfieri AA.** Consequências da produção de espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. *Rev Bras Reprod Anim*, v.34, n.2, p.79-85, 2010.
- Annunziato L, Pannaccione A, Cataldi M, Secondo A, Castaldo P, Di Renzo G, Tagliatalata M.** Modulation of ion channels by reactive oxygen and nitrogen species: a pathophysiological role in brain aging? *Neurobiol Aging*, v.23, n.5, p.819-834, 2002.
- Aquino VVF, Costa JGM, Angélico EC, Medeiros RS.** Metabólitos Secundários e ação antioxidante de *Croton helleotripifolius* e *Croton blanchetianus*. *Acta Brasil*, v.1, n.3, p.7-10, 2017.
- Ayala A, Muñoz MF, Arguelles S.** Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*, v.2014, p.1-31, 2014.
- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T.** Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell*, v.120, p.483-495, 2005.
- Barberino RS, Barros VRP, Menezes VG, Santos LP, Araújo VR, Queiroz MAA, Almeida JRGS, Palheta RC, Matos MHT.** *Amburana cearensis* leaf extract maintains survival and promotes in vitro development of ovine secondary follicles. *Zygote*, v.24, n.2, p.277-285, 2016.
- Barreiros ABS, David JM, David, J. P.** Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quím Nova*, v.29, n.1, p.113-123, 2006.
- Bedaiwy MA, Falcone T, Mohamed MS, Aleem AAN, Sharma RK, Worley SE, Thornton J, Behling EB, Sendão MC, Francescato HDC, Antunes LMG, Costa RS, Bianchi MLP.** Comparative study of multiple dosage of quercetina against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rat kidneys. *Pharmacol Rep*, v.58, n.4, p.526-532, 2006.
- Benabderrahim MA, Yahia Y, Beltaied I, Elfalleh W, Nagaz K.** Antioxidant activity and phenolic profile of a collection of medical plants from Tunisian arid and Saharan regions. *Ind Crop Prod*, v.138, p. 1-9, 2019.
- Bentov Y, Yavorska T, Esfandiari N, Jurisicova A, Casper RF.** The contribution of mitochondrial function to reproductive aging. *J Assist Reprod Genet*, v.28, n.9, p.773-783, 2011.
- Brownlee, M.** The pathobiology of diabetic complications. A unifying mechanism. *Diabetes*, v.54, n.6, p.1615-1625, 2005.
- Budani MC, Tiboni GM.** Effects of supplementation with natural antioxidants on oocytes and preimplantation embryos. *Antioxid*, v.9, p.1-25, 2020.
- Burton GJ, Jauniaux E.** Oxidative Stress. *Best Pract Res Cl Ob*, v.25, n.3, p.287-299, 2011.
- Carneiro NS, Alves JM, Alves CCF, Esperandim VR.** Essential oil of flowers from *Eugenia klotzschiana* (*Myrtaceae*): chemical composition and in vitro trypanocidal and cytotoxic activities. *Rev Virt Quím*, v.9, n.3, p.1381-1392, 2017.
- Cenini G, Lloret A, Cascella R.** Oxidative stress in neurodegenerative diseases: from a mitochondrial point of view. *Oxid Med Cell Longev*, v.2019, p.1-17, 2019.
- Chandra J, Samali A, Orrenius S.** Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, v.29, p.323-333, 2000.
- Chaube SK, Shrivastav TG, Prasad S, Tiwari M, Tripathi A, Pandey AN, Premkumar KV.** Clomiphene citrate induces ROS-mediated apoptosis in mammalian oocytes. *Open J Apop*, v.3, p.52-58, 2014.



- Chaudhary GR, Yadav PK, Yadav AK, Tiwari M, Gupta A, Sharma A, Pandey AN, Pandey AK, Chaube SK.** Necroptosis in stressed ovary. *J Biomed Sci.* v.26, n.11, p.1-6, 2019.
- Chaves N, Santiago A, Alfás JC.** Quantification of the antioxidant activity of plant extracts: analysis of sensitivity and hierarchization based on the method used. *Antioxidants (Basel)*, v.9, n.1, p.1-15, 2020.
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J.** Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB J*, v.17, n.10, p.1195-1214, 2003.
- 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.
- Dornas WC, Oliveira TT, Rodrigues-das-dores RG, Santos AF, Nagem TJ.** Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Rev Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v.28, n.3, p.241-249, 2007.
- Dunn JD, Alvarez LA, Zhang X, Soldati T.** Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox Biology*, v.6, p.472-485, 2015.
- Ferreira ACA, Maside C, Sá NAR, Guerreiro DD, Correia HHV, Leiva-Revilla J, Lobo CH, Araújo VR, Apgar GA, Brandão FZ, Figueiredo JR, Campello CC.** Balance of insulin and FSH concentrations improves the *in vitro* development of isolated goat preantral follicles in medium containing GH. *Anim Reprod Sci*, v.165, p.1-10, 2016.
- Filipović M, Marković Z, Đorović J, Marković JD, Lučić B, Amić D.** QSAR of the free radical scavenging potency of selected hydroxybenzoic acids and simple phenolics. *Comptes Rendus Chimie*, v.18, n.5, p.492-498, 2015.
- 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.1-10, 2005.
- Ghaffari Z, Rahimmalek M, Sabzalian MR.** Variations in essential oil composition and antioxidant activity in *Perovskia abrotanoides* Karel collected from different regions in Iran. *Chem Biodivers*, v.15, n.6, p.1-11, 2018.
- Ghatebi M, Zavareh S, Lashkarbolouki T, Salmani ME.** Implications from early life stress on the development of mouse ovarian follicles: Focus on oxidative stress. *J Obstet Gynaecol Res*, v.45, n.8, p.1506-1514, 2019.
- Goemans, CV, Collet JF.** Stress-induced chaperones: a first line of defense against the powerful oxidant hypochlorous acid. *F1000Res*, v.8, p.1-8, 2019.
- Gouveia BB, Macedo TJS, Santos JMS, Barberino RS, Menezes VG, Muller MC, Almeida JRGS, Figueiredo JR, Matos MHT.** Supplemented base medium containing *Amburana cearensis* associated with FSH improves *in vitro* development of isolated goat preantral follicles. *Theriogenology*, v.86, n.5, p.1275-1284, 2016.
- Guerreiro DD, Lima LF, Rodrigues GQ, Carvalho AA, Castro SV, Figueiredo JR, Bordignon V, Rodrigues APR.** *In situ* cultured preantral follicles is a useful model to evaluate the effect of anticancer drugs on caprine folliculogenesis. *Microsc Res Tec*, v.79, n.8, p.773-781, 2016.
- Guzel Y, Oktem O.** Understanding follicle growth *in vitro*: Are we getting closer to obtaining mature oocytes from *in vitro*-grown follicles in human? *Mol Reprod Dev*, v.84, p.544-559.
- Halliwell B.** Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: avoiding pitfalls. *Biomed J*, v.37, n.3, p.99-105, 2014.
- Hammadieh 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.
- Hirao Y.** Conditions affecting growth and developmental competence of mammalian oocytes *in vitro*. *Anim Sci J*, v.82, n.2, p.187-197, 2011.
- Hori YS, Kuno A, Hosoda R, Horio Y.** Regulation of FOXOs and p53 by SIRT1 Modulators under Oxidative Stress. *Plos One*, v. 8, n.9, e73875, 2013.
- Hool LC, Corry B.** Redox control of calcium channels: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*, v.9, p.409-435, 2007.
- Jiang D, James FR.** Oxidation chemistry of DNA and p53 tumor suppressor gene. *Chem Open*, v.8, n.3, p.252-265, 2019.
- Jones DP, Go YM.** Redox compartmentalization and cellular stress. *Diabetes Obes. Metab.* 12 (Suppl 2), v.116, p.116-125, 2010.
- Kada S, Bouriche H, Senador A, Demirtaş I, Özen T, Toptancı BC, Kızıl G, Kızıl M.** Protective activity of *Hertia cheirifolia* extracts against DNA damage, lipid peroxidation and protein oxidation. *Pharm Biol*, v.55, n.1, p.330-337, 2017.



- Kashka RH, Zavareh S, Lashkarbolouki T.** Augmenting effect of vitrification on lipid peroxidation in mouse preantral follicle during cultivation: Modulation by coenzyme Q10. *Syst Biol Reprod Med*, [s.l.], v. 62, n.6, p.404-414, 2016.
- Kaur S, Muthuraman A.** Therapeutic evaluation of rutin in two-kidney oneclip model of renovascular hypertension in rat. *Life Sci*, v.150, p.89-94, 2016.
- Kishida K, Klann E.** Sources and targets of reactive oxygen species in synaptic plasticity and memory. *Antioxid Redox Signal*, v.9, n.2, p.233-244, 2007.
- Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE.** Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Letters*, v.495, p.12-15, 2001.
- Kreeger PK, Fernandes NN, Woodruff TK, Shea LD.** Regulation of mouse follicle development by follicle stimulating hormone in a three-dimensional *in vitro* culture system is dependent on follicle stage and dose. *Biol Reprod*, v.73, n.5, p.942-950, 2005.
- Lee L, Asada H, Kizuka F, Tamura I, Maekawa R, Taketani T, Sato S, Yamagata Y, Tamura H, Sugino N.** Changes in histone modification and DNA methylation of the StAR and Cyp19a1 promoter regions in granulosa cells undergoing luteinization during ovulation in rats. *Endocrinology*, v.154, p.458-470, 2013.
- Li B, Weng Q, Liu Z, Shen M, Zhang J, Wu W, Liu H.** Selection of antioxidants against ovarian oxidative stress in mouse model. *J Biochem Mol Toxic*, v.31, n.12, p.1-6, 2017.
- Li L, Wu J, Luo M, Sun Y, Wang G.** The effect of heat stress on gene expression, synthesis of steroids, and apoptosis in bovine granulosa cells. *Cell Stress Chaperones*, v.21, p.467-475, 2016.
- Lin D, Xiao M, Zhao J, Li Z, Xing B, Li X, Kong M, Li L, Zhang Q, Liu Y, Chen H, Qin W, Wu H, Chen S.** An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules*, v.21, n.10, p.1-19, 2016.
- Lins TLBG, Cavalcante AYP, Santos JMS, Menezes VG, Barros VRP, Barberino RS, Bezerra ES, Macedo TJS, Matos MHT.** Rutin can replace the use of three other antioxidants in the culture medium, maintaining the viability of sheep isolated secondary follicles. *Theriogenology*, v.89, p.263-270, 2017.
- Luz VB, Araújo VR, Duarte ABG, Silva GM, Chaves RN, Brito IR, Serafim MKB, Campello CC, Feltrin C, Bertoline M, Almeida AP, Santos RR, Figueiredo JR.** Kit ligand and insulin-like growth factor I affect the *in vitro* development of ovine preantral follicles. *Small Rumin Research*, v.115, n.1-3, p.99-102, 2013.
- Magalhães DM, Fernandes DD, Mororó MBS, Silva CMG, Rodrigues GQ, Bruno JB, Matos MHT, Campello CC, Figueiredo JR.** Effect of the medium replacement interval on the viability, growth and *in vitro* maturation of isolated caprine and ovine pre-antral follicles. *Reprod Domest Anim*, v.46, n.1, p.134-140, 2011.
- Maia CN.** Análise fitoquímica e atividade antibacteriana *in vitro* de extrato de plantas do Cerrado, Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros – MG, 2008.
- Martelli F, Nunes FMF.** Radicais livres: em busca do equilíbrio. *Ciência e Cultura*, v.66, n.3, p.54-57, 2014.
- Martindale JL, Holbrook NJ.** Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol*, v.192, p.944-984, 2002.
- Massignam ET, Ferreira M, Sanguinet E, Dupont A, Klamt F, Frantz N, Bos-Mikich A.** Antioxidant defense capacity of ovarian tissue after vitrification in a metal closed system. *JBRA Assist Reprod*, v.22, n.3, p.199-204, 2018.
- Mbemya GT, Cadenas J, Ribeiro de Sá NA, Damasceno Guerreiro D, Donfack NJ, Alberto Vieira L, Canafistula de Sousa FG, Geraldo Alves B, Lobo CH, Santos FW, Lima Pinto FDC, Loiola Pessoa OD, Smitz J, Comizzoli P, Figueiredo JR, Rodrigues APR.** Supplementation of *in vitro* culture medium with FSH to grow follicles and mature oocytes can be replaced by extracts of *Justicia insularis*. *PLoS One*, v.13, n.12, p.1-21, 2018.
- Morais SM, Catunda Júnior FEA, Silva ARA; Martins Neto JS, Rondina D, Cardoso JHL.** Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de cróton do nordeste do Brasil. *Química Nova*, v.29, n.5, p.907-910, 2006.
- Morita Y, Wada-Hiraike O, Yano T, Shirane A, Hirano M, Hiraike H, Koyama S, Oishi H, Yoshino O, Miyamoto Y, Sone K, Oda K, Nakagawa S, Tsutsui K, Taketani Y.** Resveratrol promotes expression of SIRT1 and StAR in rat ovarian granulosa cells: an implicative role of SIRT1 in the ovary. *Reprod Biol Endocrinol*, v.10, n.14, p.1-10, 2012.
- Moller IM, Kristensen BK.** Protein oxidation in plant mitochondria as a stress indicator. *Photochem*



- Photobiol Sci, v.3, n.8, p.730-735, 2004.
- Nascimento TS, Silva ISM, Alves MCMA, Gouveia BB, Barbosa LMR, Macedo TJS, Santos JMS, Monte APO, Matos MHT, Padilha FF, Lima-Verde IB.** Effect of red propolis extract isolated or encapsulated in nanoparticles on the *in vitro* culture of sheep preantral follicle: Impacts on antrum formation, mitochondrial activity and glutathione levels. *Reprod Domest Anim*, v.54, n.1, p.37-38, 2019.
- Oliveira MC, Schoffen JPF.** Oxidative stress action in cellular aging. *Braz Arch Biol Tech* v.53, n.6, p.1333-1342, 2010.
- Oroian M, Escriche I.** Antioxidants: characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Res Int*, v.74, p.10-36, 2015.
- Pinto M, Moraes CT.** Mechanisms linking mtDNA damage and aging. *Free Radic Biol Med*, v.85, p.250-258, 2015.
- 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.
- Rajani S, Chattopadhyay R, Goswami SK, Ghosh S, Sharma S, Chakravarty B.** Evaluation of oocyte quality in polycystic ovary syndrome and endometriosis by spindle imaging and levels of reactive oxygen species in the follicular fluid and its relationship with the FIV-ET result. *J Hum Reprod Sci*, v.5, p.187-193, 2012.
- Reed TT.** Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. *Free Radic Biol Med*, v.51, n.7, p.1302-1319, 2011.
- Ribeiro SMR, Queiroz JH, Pelúzo MCG, Costa NMB, Matta SLP, Queiroz MELR.** A formação e os efeitos das espécies reativas do oxigênio no meio biológico. *Biosci J*, v.21, n.3, p.133 – 149, 2005.
- Rizzo A, Roscino MT, Binetti F, Sciorsci RL.** Roles of reactive oxygen species in female reproduction. *Reprod Domest Anim*, v.47, n.2, p.344-352, 2012.
- Ron D, Walter P.** Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biol*, v.8, p.519-529, 2007.
- Rocha CD.** Vitricificação de tecido ovariano de fetos bovinos associada ao resveratrol. 2017. 94 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/18468> >. Acesso em: 05 mai. 2018.
- Sa NAR, Bruno JB, Guerreiro DD, Cadenas J, Alvez BG, Cibin FWS, Leal-Cardoso JH, Gastal EL, Figueiredo JR.** Anethole reduces oxidative stress and improves *in vitro* survival and activation of primordial follicles. *Braz J Med Biol Res*, v.51, n.8, p.1-8, 2018.
- Saeed-Zidane M, Linden L, Salilew-Wondim D, Held E, Neuhooff C, Tholen E, Hoelker M, Schellander K, Tesfaye D.** Cellular and exosome mediated molecular defense mechanism in bovine granulosa cells exposed to oxidative stress. *PlosOne*, v.12, n.11, p.1-24, 2017.
- Salavati M, Ghafari F, Zhang T, Fouladi-Nashta AA.** Effects of oxygen concentration on *in vitro* maturation of canine oocytes in a chemically defined serum-free medium. *Reproduction*, v.144, p.547-556, 2012.
- Santos LP, Barros VRP, Cavalcante AYP, Menezes VG, Macedo TJS, Santos JMS, Araújo VR, Queiroz AA, Matos MHT.** Protein localization of epidermal growth factor in sheep ovaries and improvement of follicle survival and antrum formation *in vitro*. *Reprod Domest Anim*, v.49, n.5, p.783-789, 2014.
- Santos LP, Barros VRP, Cavalcante AYP, Menezes VG, Macedo TSJ, Santos JMS, Araújo VR, Queiroz MAA, Matos MHT.** Protein localization of epidermal growth factor in sheep ovaries and improvement of follicle survival and antrum formation *in vitro*. *Reprod Domest Anim*, v.49, p.783-789, 2014.
- Sharma RK, Azeem A, Agarwal A.** Spindle and chromosomal alterations in metaphase II oocytes. *Reprod Sci*, v.20, p.1293-1301, 2013.
- Shi L, Zhang J, Lai Z, Tian Y, Fang L, Wu M, Xiong J, Qin X, Luo A, Wang S.** Long-term moderate oxidative stress decreased ovarian reproductive function by reducing follicle quality and progesterone production. *PloS One*, v.11, n.9, p.1-18, 2016.
- Sies, H.** Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol*, v.4, p.180-183, 2015.
- Silva GM, Araújo VR, Duarte ABG, Lopes CAP, Figueiredo JR.** Papel dos antioxidantes no cultivo *in vitro* de células ovarianas. *Rev Bras Reprod Anim*, v.35, n.3, p.315-326, 2011.
- Silva GM, Rosseto R, Chaves RN, Duarte ABG, Araújo VR, Feltrin C, Burnuci MP, Anselmo-Franci JA, Xu M, Woodruff TK, Campello CC, Figueiredo JR.** *In vitro* development of secondary



- follicles from pre-pubertal and adult goats cultured in two-dimensional or three-dimensional systems. *Zygote*, v.23, n.4, p.475-484, 2015.
- Sousa M. M, Silva HR, Vieira-Jr GM, Ayres MCC, Costa CLS, Araújo DS, Cavalcante LCD, Barros EDS, Araújo PBM, Brandão MS, Chaves MH.** Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quím Nova*, v.30, n.2, p.351-355, 2007.
- Songsasen N, Comizzoli J, Nagashima J, Fujihara M, Wildt DE.** The domestic dog and cat as models for understanding the regulation of ovarian follicle development *in vitro*. *Reprod Domest Anim*, v.47, p.13-18, 2012.
- Sugino N, Takiguchi S, Kashida S, Karube A, Nakamura Y, Kato A.** 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.
- Tamura H, Takasaki A, Miwa I, Taniguchi K, Maekawa R, Asada H, Taketani H, Matsuoka A, Yamagata Y, Shimamura K, Morioka H, Ishikawa H, Reiter RJ, Sugino N.** Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J Pineal Res*, v.44, p.280-287, 2008.
- Tanabe H, Tamura H, Taketani T, Okada M, Lee L, Tamura I, Maekawa R, Asada H, Yamagata Y, Sugino N.** Melatonin protects the integrity of granulosa cells by reducing oxidative stress in nuclei, mitochondria, and plasma membranes in mice. *J Reprod Develop*, v.6, n.1, p.35-41, 2015.
- Tortora GJ, Funke BR, Case CL.** *Microbiologia*. 12. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.
- Tsicas D.** Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: analytical and biological challenges. *Anal Biochem*, v.524, p.13-30, 2017.
- Tu BP, Weissman JS.** Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J Cell Biol*, v.164, p.341-346, 2004.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Bioch Cell Biol*, v.39, n.1, p.44-84, 2007.
- Vistoli G, De Maddis D, Cipak A, Zarkovic N, Carini M, Aldini G.** Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radic Res*, v.47 (Suppl 1), n.3-27, p.1-272013.
- Wang Y, Yang C, Elsheikh NAH, Li C, Yang F, Wang G, Li L.** HO-1 reduces heat stress-induced apoptosis in bovine granulosa cells by suppressing oxidative stress. *Aging*, v.11, n.15, p.5535-5547, 2019.
- Wang W, Yang H, Johnson D, Gensler C, Decker E, Zhang G.** Chemistry and biology of  $\omega$ -3 PUFA peroxidation-derived compounds. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, v.132, p.84-91, 2017.
- Wang F, Tian XT, Zhang L, He C, Ji P, Tan D, Liu G.** Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after *in vitro* fertilization. *Fertil Steril*, v.101, n. 2, p.577-586, 2014.
- Winczura A, Zdzalik D, Tudek B.** Damage of DNA and proteins by major lipid peroxidation products in genome stability. *Free Radic Res*, v.46, n.4, p.442-459, 2012.
- Wu J, Jing L, Yuan H, Peng S.** T-2 toxin induces apoptosis in ovarian granulosa cells of rats through reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. *Toxicol Lett*, v.202, n.3, p.168-177, 2011.
- Xiang Y, Lai F, He G, Li Y, Yang L, Shen W, Huo H, Zhu J, Dai H, Zhang Y.** Alleviation of rosup-induced oxidative stress in porcine granulosa cells by anthocyanins from red-fleshed apples. *PLoS One*, v. 12, n.8, p.1-16, 2017.
- Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC.** Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest*, v.115, p.2656-2664, 2005.
- Yin H, Kristensen SG, Jiang H, Rasmussen A, Andersen CY.** Survival and growth of isolated pre-antral follicles from human ovarian medulla tissue during long-term 3D culture. *Hum Reprod*, v.31, n.7, p.1531-1539, 2016.
- 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, n.5, p.559-567, 2009.
- Zhang JQ, Gao BW, Wang J, Ren QL, Chen JF, Ma Q, Zhang ZJ, Xinget BS.** Critical role of FoxO1 in granulosa cell apoptosis caused by oxidative stress and protective effects of grape seed procyanidin B2. *Oxid Med Cell Longev*, v.2016, p.1-15, 2016.
- Zhang Y, Guo J, Nie XW, Li ZY, Wang YM, Liang S, Li S.** Rosmarinic acid treatment during porcine oocyte maturation attenuates oxidative stress and improves subsequent embryo development *in vitro*. *Peer J*, v.7, e6930, 2019.



Costa *et al.* Influência das espécies reativas de oxigênio durante o cultivo *in vitro* de oócitos e folículos ovarianos de mamíferos domésticos.

---

**Zhao S, Pang Y, Zhao X, Du W. Hao H, Zhu H.** Effects of lipopolysaccharide on maturation of bovine oocyte *in vitro* and its possible mechanisms. *Oncotarget*, v.8, n.3, p.4656-4667, 2017.

---