

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

**UTILIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES (α -TOCOFEROL E
TERNATINA) NO CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS
CAPRINOS**

ISABEL BEZERRA LIMA-VERDE

Recife-PE

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

ISABEL BEZERRA LIMA-VERDE

**UTILIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES (α -TOCOFEROL E
TERNATINA) NO CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS
CAPRINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, Área de Reprodução, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de **MESTRE** em Ciência Veterinária.

Recife-PE

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

**UTILIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES (α -TOCOFEROL E
TERNATINA) NO CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS
CAPRINOS**

Dissertação de Mestrado elaborada por

ISABEL BEZERRA LIMA-VERDE

Aprovada pela

COMISSÃO EXAMINADORA

Paulo Fernandes de Lima
- Orientador -

Dra. Fabíola Paula Lopes
- Examinador -

Dr. Marcos Correia
- Examinador -

Dra. Ana Maria Carneiro Leão
- Examinador -

Recife, 22 de Maio de 2006

*Aos meus avós Wilson, Lucíola e Neuza,
in memoriam e ao meu avô Joaquim, dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo o que eu tenho na minha vida e por ter me dado força e coragem para alcançar meus objetivos e continuar lutando por eles.

Aos meus pais, Luiz Wilson e Fátima, pela minha vida, por estarem sempre presentes me incentivando, apoiando e orientando em todos os momentos. Obrigada por nunca terem me faltado quando eu precisei de vocês e por todo o amor e dedicação.

Aos meus irmãos Juliana e Daniel, minha cunhada Cibele e meus sobrinhos João Pedro, Marina, Júlia e Lucas pela presença e apoio constante na minha vida, pela união que nos torna cada vez mais ligados, independente de onde estejamos.

Aos Professores Paulo Fernandes de Lima e Marcos Antonio Lemos de Oliveira, pela orientação, apoio e ensinamentos e por terem me dado a oportunidade de fazer o Mestrado, contribuindo para o meu crescimento profissional e pessoal.

Aos Professores José Ricardo de Figueiredo e Ana Paula Ribeiro Rodrigues, que me abriram as portas do LAMOFOPA e possibilitaram a realização deste trabalho. Agradeço cada palavra, cada ensinamento, cada conselho e a atenção dispensada no decorrer deste período.

Ao Dr. José Roberto Viana Silva e à Dra. Regiane Rodrigues dos Santos pelas sugestões, correções e pelo aprendizado.

À Dra. Sônia Nair Bão e sua equipe do Laboratório de Microscopia Eletrônica da UnB, pela atenção, dedicação e ensinamentos.

Ao Dr. Edilberto Silveira da UFC por ter cedido parte dos antioxidantes testados neste trabalho, pela atenção e sugestões.

A todos os membros do LAMOFOPA (Erisvaldo, Karla, Guilherme, Mônica, Priscilla, Lívia, Janaina, Júnior, Rebeca, Viviane, Roberta, Juliana, Jamily, Fabrício, Helena, Cláudio, Regiane, José Roberto, Ana Paula, Dr. Ricardo) pela amizade, ajuda, paciência e apoio para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos e companheiros sempre presentes, que nunca me faltaram nos momentos que mais precisei de ajuda, de companhia, de coragem e de conselhos: Jamily Bezerra, Helena Matos, João Carlos Paula, Fabricio Martins e Cláudio Lopes.

À minha amiga Fernanda Dórea e seus pais Isa e Adalberto, aos meus tios Francisco e Carmelina, Nonato e Rosa, pela acolhida excepcional enquanto estive em Brasília e pelo carinho e atenção comigo durante esse período.

À amiga Janaína Bittencourt Loos (*in memoriam*), pela sua amizade, companheirismo e exemplo de determinação e coragem.

Às amigas Grazielle Serpa, Mirele Serpa e Fernanda Gadelha pela amizade sincera e por estarem sempre presentes compartilhando todos os momentos durante os muitos anos de amizade.

Aos amigos da Pós Graduação da UFRPE, Bárbara Loureiro, Érica Moraes, Grazielle Aleixo, Jorge Motta, Maico Henrique Santos e Sildivane Silva pelo apoio e amizade.

Aos professores do PPGCV da UFRPE pelos ensinamentos e pela atenção dispensados durante o curso.

À Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa – FUNCAP, pela bolsa de estudos concedida durante a realização do curso de Mestrado.

Aos que aqui não foram mencionados, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Páginas
AGRADECIMENTOS	v
SUMÁRIO	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. Foliculogênese.....	2
2.2. Ativação de folículos pré-antrais <i>in vivo</i>	3
2.3. Ativação e crescimento de folículos pré-antrais <i>in vitro</i>	4
2.4. Atresia folicular.....	5
2.4.1 Apoptose	7
2.5. Importância da composição do meio sobre o desenvolvimento de folículos pré-antrais <i>in vitro</i>	8
2.6. α -tocoferol e Ternatina.....	10
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	13
4. PUBLICAÇÕES.....	24
4.1. Influence of α -tocopherol and ternatin on morphology and activation of goat preantral follicles cultured <i>in vitro</i>	25
4.2. Implicações do estresse oxidativo no ovário e embrião mamífero.....	51

Título: Utilização de substâncias antioxidantes (α -tocoferol e ternatina) no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos

Autor: Isabel Bezerra Lima-Verde

Orientador: Paulo Fernandes de Lima

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do α -tocoferol e da ternatina sobre morfologia, ativação e crescimento de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro* e realizar uma revisão de literatura sobre temas relacionados com a origem do estresse oxidativo e das espécies reativas de oxigênio, bem como os mecanismos protetores contra os radicais livres, as implicações destes no ovário e embrião mamífero e o papel do óxido nítrico neste processo. No primeiro trabalho, o córtex ovariano foi dividido em fragmentos, sendo um destes imediatamente fixado (controle). O restante dos fragmentos foi cultivado *in vitro* por 1 ou 5 dias a 39°C e de 5% CO₂, em Meio Essencial Mínimo (MEM) suplementado e adicionado ou não de 5, 10 ou 15 μ M de α -tocoferol ou ternatina. Os fragmentos do controle e os cultivados, foram fixados em 10% de formol ou em 2% de paraformaldeído e 2,5% de glutaraldeído em 0,1M de tampão cacodilato de sódio para análise histológica e ultra-estrutural, respectivamente. Os folículos foram classificados em primordiais ou em desenvolvimento, bem como em normais ou degenerados. Quando comparados com o controle, o cultivo *in vitro* levou a uma redução nas percentagens de folículos pré-antrais morfologicamente normais em todos os tratamentos com α -tocoferol ou ternatina ($P < 0,05$) após 5 dias de cultivo. No entanto, quando comparado com o controle, o cultivo de córtex ovariano por 5 dias aumentou as taxas de ativação folicular em todos os tratamentos ($P < 0,05$). Em comparação com o MEM sozinho, a adição de α -tocoferol ou ternatina no meio de cultivo não influenciou a ativação folicular ($P > 0,05$), exceto no dia 1 de cultivo, quando as concentrações de 5 e 15 μ M foram utilizadas respectivamente, e mostraram

um aumento significativo nos percentuais de ativação folicular, em comparação aos outros tratamentos. A análise ultra-estrutural mostrou que folículos cultivados por 5 dias em meio contendo antioxidantes, estavam degenerados. Esta degeneração não ocorreu nos folículos tratados apenas com MEM ou no controle, os quais mantiveram sua integridade ultra-estrutural. Em conclusão, este trabalho demonstrou que α -tocoferol e ternatina podem promover ativação folicular, no entanto, a adição destes antioxidantes nas concentrações testadas, reduziu a viabilidade folicular após o cultivo *in vitro*. No segundo trabalho, verificou-se que as espécies reativas de oxigênio (EROs) ou de nitrogênio (ERN) ou radicais livres são produtos do metabolismo orgânico normal e seu acúmulo pode gerar o estresse oxidativo. Este, por sua vez, causa injúrias celulares podendo levá-las à morte, estando este processo envolvido com a degeneração e/ou apoptose celular durante o desenvolvimento embrionário e em diferentes órgãos, como o ovário mamífero. No ovário de camundongas são produzidas EROs durante a regressão luteal, e estas estão envolvidas no processo de ativação folicular e retomada espontânea da meiose em oócitos. Embora sejam produzidos durante processos fisiológicos, o acúmulo de radicais livres no ovário mamífero pode desencadear patologias. No embrião, os radicais livres são produzidos normalmente devido ao metabolismo normal. Porém em ambientes *in vitro* com altas concentrações de oxigênio, o desenvolvimento do embrião pode ser prejudicado. O óxido nítrico é considerado um radical livre e participa de processos patológicos e fisiológicos como inflamação, ovulação, implantação embrionária e contração uterina. Para proteger os sistemas biológicos dos danos celulares causados pelos radicais livres, o organismo utiliza enzimas como catalase, superóxido-dismutase e glutathione peroxidase, e mecanismos que incluem substâncias antioxidantes tais como vitamina C, vitamina E, β -caroteno dentre outras.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA
Dissertação de Mestrado em Ciência Veterinária
Recife, 22 de Maio de 2006

Title: Use of antioxidants (α -tocopherol and ternatin) in *in vitro* culture of goat preantral follicles.

Author: Isabel Bezerra Lima-Verde

Advisor: Paulo Fernandes de Lima

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of α -tocopherol and ternatin on morphology and activation of goat preantral follicles cultured *in vitro* and realize a review including the origin of oxidative stress and reactive oxygen species, as well as the mechanisms that protects the organism against free radicals, implications of them in mammalian ovary and embryo and the role of nitric oxide in this process. In the first work, the ovarian cortex was divided into small pieces and one fragment was immediately fixed (control). The remaining fragments were *in vitro* cultured for 1 or 5 days at 39°C and 5% CO₂, in Minimum Essential Medium (MEM) supplemented and added or not by 5, 10 or 15 μ M of α -tocopherol or ternatin. Control and cultured ovarian fragments were fixed in 10% formaline or in 2% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1M sodium cacodylate buffer for histological and ultrastructural analysis, respectively. Follicles were classified as primordial or developing, as well as normal or degenerated. When compared with control, *in vitro* culture led to a decrease in the percentages of morphologically normal preantral follicles in all treatments with α -tocopherol or ternatin ($P < 0.05$) after 5-days culture. Furthermore, when compared with control, culture of ovarian cortex for 5 days increased the percentages of follicular

activation in all treatments ($P < 0.05$). In comparison with MEM alone, addition of α -tocopherol or ternatin in the culture medium did not affect follicular activation ($P > 0.05$), except at day 1 of culture, when concentrations of 5 and 15 μM were used respectively and showed a significantly increase of follicular activation, in comparison with others treatments. Ultrastructural analysis showed that follicles cultured for 5 days in medium containing antioxidants were degenerated. This degeneration did not occur in follicles treated with MEM alone or control, which maintained their ultrastructural integrity. In conclusion, this study demonstrated that α -tocopherol and ternatin can promote follicular activation, however the addition of antioxidants in the tested concentrations reduced the follicular viability after *in vitro* culture. The second work verified that reactive oxygen (ROS) or nitrogen (RNS) species or free radicals are products of normal organic metabolism and their accumulation can generate the oxidative stress. Then, this stress causes cellular damage, leading to death. This process is involved with cellular degeneration and/or apoptosis during embryos development and in different organs, such as the mammalian ovary. In murine ovary, ROS are produced during luteal regression and they are involved in the process of follicular activation and spontaneous meiosis resumption in oocytes. Although these are physiological processes, accumulation of free radicals in the mammalian ovary may unchain pathologies. In the embryo, free radicals are normally produced due to normal metabolism. However, in *in vitro* environment with high oxygen concentrations, embryo development can be damaged. Nitric oxide is considered a free radical and takes part in pathologic and physiologic processes, such as inflammation, ovulation, embryo implantation and uterine contraction. To protect the biological systems from cellular damage caused by free radicals, the organism uses enzymatic mechanism, which involves, for instance, catalase, susperoxide-dismutase and glutation peroxidase and

others that include antioxidants substances, such as vitamin C, vitamin E, β -carotene etc.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA
Master's Dissertation in Veterinary Science
Recife, May 22, 2006

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Percentage of morphologically normal goat preantral follicles on control (non cultured) and after culture in presence or absence of α -tocopherol or ternatin.....	44

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1 - Histological sections of ovarian tissue cultured for 5 days in 5µM of α-tocoferol (A and C) or ternatin (B and D) showing normal and degenerated follicles respectively (400X).....	45
Figura 2 - Percentage of developing follicles among morphologically normal follicles, which had been untreated (control) or cultured for 1 and 5 days in presence or absence of α-tocopherol or ternatin.....	46
Figura 3 - Follicular diameter among morphologically normal follicles, which had been untreated (control) or cultured for 1 and 5 days in presence or absence of α-tocopherol or ternatin.....	47
Figura 4- Ultrastructural analysis of non cultured preantral follicle (control) (4200X)	48
Figura 5- Ultrastructural analysis of preantral follicle cultured for 5 days in MEM alone (A) and 5µM of α-tocoferol (B) (4200X and 3000X)....	49
Figura 6 - Ultrastructural analysis of preantral follicle cultured for 5 days in 5µM (A) e 10µM (B) of ternatin (3750X and 5250X).....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

BMP-15	Proteína Morfogenética do Osso
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GDF-9	Fator de Diferenciação do Crescimento-9
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
IAA	Ácido 3-Indol-Acético
ITS	Insulina, Transferrina e Selênio
KL	Kit Ligand
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MEM	Meio Essencial Mínimo
MOIFOPA	Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OH [·]	Radical hidroxila
ROS	Reactive Oxygen Species
TER	Ternatina
TOC	α-tocoferol
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco

1.INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de biotécnicas relacionadas com a biologia reprodutiva tem sido extensivamente realizado nos últimos anos visando a otimização do aproveitamento de material genético de animais de alto valor comercial ou em via de extinção. Nos últimos anos, muitos esforços têm sido empregados para o avanço da biotécnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA), que em muito tem contribuído para um melhor entendimento da biologia ovariana.

Tendo em vista que o ovário mamífero contém milhares de oócitos inclusos em folículos primordiais e que poucos destes folículos desenvolvem-se até o estágio de folículo pré-ovulatório (EPPIG e O'BRIEN, 1996), a biotécnica de MOIFOPA objetiva recuperar, preservar e cultivar *in vitro* um grande número de folículos pré-antrais visando a sua ativação, crescimento e completa maturação, prevenindo-os da morte folicular, que ocorre naturalmente *in vivo*.

Estudos referentes aos fatores e mecanismos envolvidos no desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos são escassos (SILVA et al., 2004a), principalmente em relação à prevenção da morte folicular nesta espécie. Sabe-se que o estresse oxidativo pode ser uma das causas da perda folicular no ovário (BEHRMAN et al., 2001). Neste sentido, acredita-se que a utilização de substâncias antioxidantes como α -tocoferol e a ternatina no desenvolvimento de folículos pré-antrais cultivados *in vitro*, possa exercer um efeito atenuante no processo de atresia

Este trabalho propôs verificar se a ação antioxidante de substâncias como o α -tocoferol e a ternatina podem preservar a morfologia e estimular a ativação de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Foliculogênese

A foliculogênese, evento iniciado na vida pré-natal na maioria das espécies, pode ser definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, iniciando-se com a formação do folículo primordial e culminando com o estágio de folículo de De Graaf ou pré-ovulatório (SAUMANDE, 1991).

Os folículos, constituídos por um oócito envolto por células somáticas (da granulosa e tecais), são as estruturas ovarianas que permitem ao ovário desenvolver suas duas funções: a gametogênese e a esteroidogênese (HAFEZ, 2000). Estes estão localizados no estroma do córtex ovariano, podendo distinguir-se os pré-antrais ou não cavitários, constituídos pelos folículos primordiais, primários e secundários, e os antrais ou cavitários que são compostos pelos folículos terciários e pré-ovulatórios ou de De Graaf (HAFEZ, 2000).

Morfologicamente, os folículos primordiais apresentam um oócito envolvido por uma camada de células da pré-granulosa de formato pavimentoso (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005). Após a formação dos folículos primordiais, as células da pré-granulosa param de se multiplicar e entram num período de quiescência, retomando seu crescimento após sua ativação. Quando o folículo apresenta uma camada de células da granulosa de formato cúbico, ele é chamado primário. No estágio de folículo secundário, que apresenta duas ou mais camadas de células da granulosa em intensa atividade mitótica, a zona pelúcida é formada, e as células precursoras da teca são recrutadas do estroma. Durante a evolução dos folículos secundários, o acúmulo de líquido em seu interior origina uma cavidade denominada de antro folicular, sendo neste

estágio denominado de folículo terciário e podendo ser observadas as camadas interna e externa da teca (MATOS, 2003)

Sob condições normais, a maioria dos folículos presentes no ovário (99,9%) sofre atresia, levando a uma completa exaustão da reserva folicular na idade adulta (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005). No entanto, recentemente Bukovsky et al. (2004) e Johnson et al. (2005) propuseram a existência de formação de novas células germinativas em fêmeas adultas.

No tocante ao início do crescimento folicular, esta fase envolve a passagem de folículos primordiais quiescentes para a fase de crescimento e é caracterizada pelos seguintes eventos: proliferação das células da granulosa, mudanças na forma destas células de pavimentosa para cúbica e aumento de tamanho do oócito (BRAW-TAL, 2002). Este evento também é denominado de ativação folicular. Embora o processo de ativação folicular não esteja completamente elucidado, vários estudos *in vitro* têm demonstrado a ação de várias substâncias intra e extra-ovarianas, conforme descrito nas secções posteriores.

2.2. Ativação dos folículos pré-antrais in vivo

O primeiro sinal de ativação dos folículos primordiais é a retomada da proliferação das células da granulosa, ou seja, o folículo primordial, o qual apresenta-se circundado por uma camada de células da granulosa de formato pavimentoso (BRAW-TAL e YOSSEFI, 1997) transforma-se em folículo primário (VAN DEN HURK et al., 1997), passando pelos estágios de crescimento seguintes, à medida que as células da granulosa proliferam.

Conforme mencionado anteriormente, os mecanismos responsáveis pela ativação e crescimento dos folículos primordiais, bem como o período no qual estes processos se

iniciam ainda são pouco conhecidos (FORTUNE et al.,2000). Hirshfield (1991) sugeriu que a ativação e o crescimento dos folículos primordiais devem ser controlados tanto por fatores endócrinos (gonadotrofinas), como por fatores intraovarianos (fatores de crescimento). Em caprinos, recentemente foi demonstrada a presença de Kit-Ligand (KL), fator de diferenciação de crescimento-9 (GDF-9), proteína morfogenética do osso-15 (BMP-15), ativina, folistatina, fator de crescimento epidermal (EGF) e seus receptores em folículos primordiais, sugerindo que estes fatores podem estar envolvidos na ativação. (SILVA et al., 2004ab, SILVA et al., 2005, SILVA et al., 2006).

2.3. Ativação e crescimento de folículos pré-antrais *in vitro*

É indiscutível que grandes progressos já tenham sido observados no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais em diferentes espécies animais. A ativação de folículos primordiais caprinos (MARTINS et al., 2005; MATOS et al., 2006ab), ovinos (ANDRADE et al., 2005), bovinos (WANDJI et al., 1996; BRAW-TAL e YOSSEFI, 1997) e babuínos (FORTUNE et al.,1998) também foi alcançada com êxito após cultivo de pequenos fragmentos de córtex ovariano.

No tocante ao desenvolvimento de folículos primários e secundários, em felinos (JEWGENOW e STOLTE, 1996) e marsupiais (BUTCHER e ULLMAN, 1996) já foi observado o crescimento desses folículos ovarianos isolados após o cultivo *in vitro*, porém sem a formação de antro. Em felinos (JEWGENOW e PITRA, 1993) a adição de FSH ao meio de cultivo estimulou o crescimento folicular enquanto a adição do Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) e Insulina + Transferrina + Selênio (ITS) ao meio resultou na manutenção da integridade dos folículos pré-antrais cultivados *in vitro* (JEWGENOW e GORITZ, 1995). Nas espécies ovina (CECCONI et al., 1999), bovina (GUTIERREZ et al., 2000; McCAFFERY et al., 2000) e caprina (HUANMIN e YONG,

2000) folículos secundários isolados desenvolveram-se *in vitro* até o estágio antral. O desenvolvimento de folículos antrais a partir de folículos primários ou secundários foi igualmente relatado em humanos (ROY e TREACY, 1993). Em suínos, folículos secundários crescidos *in vitro* chegaram até a ovulação e tiveram seus oócitos fecundados *in vitro* (HIRAO et al., 1994) com desenvolvimento até o estágio de blastocisto (WU et al., 2001).

Apesar do grande avanço no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais com as referidas espécies supracitadas, os resultados mais satisfatórios têm sido observado em animais de laboratório. Em camundongos, o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais foi descrito por vários autores (EPPIG, 1997; QVIST et al., 1990; CARROLL et al., 1991; NAYÜDU e OSBORN, 1992). Entretanto, os melhores resultados foram observados por O'Brien et al. (2003) que obtiveram o nascimento de 53 camundongos a partir de folículos primordiais desenvolvidos, maturados e fecundados *in vitro*. Carroll et al. (1990) obtiveram também o nascimento *in vitro* de camundongos após congelação e descongelação de folículos pré-antrais.

No entanto, apesar dos avanços observados em camundongas, o nascimento a partir de folículos pré-antrais maturados *in vitro* ainda não foi alcançado em espécies domésticas. Uma das razões que em muito contribui para isso, é a perda folicular causada pela atresia durante o processo de crescimento e maturação *in vitro*, semelhante ou superior ao que ocorre *in vivo*.

2.4. Atresia folicular

Os folículos ovarianos pré-antrais (FOPA) representam 90% da população folicular (SAUMANDE, 1991) e constituem o estoque de gametas femininos durante a

vida reprodutiva do animal (LIU et al., 2001). No entanto, cerca de 99,9% dos folículos de um ovário não ovulam, mas sofrem um processo fisiológico conhecido como atresia, que causa a morte do folículo, por via degenerativa e/ou apoptótica (MIKKELSEN et al., 2001; SVANBERG, 1999).

A atresia é um fenômeno natural que leva à exaustão do pool de folículos pré-antrais (MORITA e TILLY, 1999) e é comum a todas as espécies domésticas, podendo ocorrer em qualquer estágio do desenvolvimento folicular (GLAMOCLIJIA et al., 2005). Este processo afeta principalmente folículos antrais, especialmente quando estes atingem um tamanho no qual ocorre a diferenciação terminal das células da granulosa e da teca (SAUMANDE, 1991; LUSSIER et al., 1987; HIRSHFIELD, 1988). Nos estágios iniciais da foliculogênese, a atresia é iniciada no oócito e em seguida ocorre nas células da granulosa (MORITA e TILLY, 1999), verificando-se o processo inverso em folículos maduros (GLAMOCLIJIA et al., 2005).

A atresia pode ser demonstrada utilizando-se técnicas como histologia clássica (HC) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Os principais achados observados na microscopia ótica em folículos atrésicos são picnose nuclear, destacamento das células da granulosa e ausência de integridade da membrana basal. Embora a histologia clássica seja uma técnica que identifica somente as alterações superficiais, por outro lado é de fácil execução, baixo custo, revela resultados de forma rápida e seus achados podem ser avaliados pela análise ultra-estrutural. Nesta, observa-se nos folículos compactação e segregação da cromatina, condensação do citoplasma, fragmentação do núcleo, protusão e ruptura da superfície celular, formando assim corpos apoptóticos de tamanhos variados (KERR, 1995).

2.4.1 Apoptose

A apoptose é um processo fisiologicamente importante para o desenvolvimento embrionário normal, bem como para a homeostase no tecido adulto (AMSTERDAN et al.,2003). Esse processo é altamente regulado, e a célula morre devido a vários estímulos internos e externos, tais como oscilação nos níveis hormonais, regeneração tecidual, estresse oxidativo, quimioterapia e radioterapia (SVANBERG, 1999; EARLE, 2001).

Uma característica marcante da apoptose é a ativação de nucleases endógenas que quebram o DNA a cada 180-200 pares de bases (YU et al.,2005). No ovário, uma alta taxa de apoptose folicular ocorre durante a vida reprodutiva, porém pouco se sabe a respeito da perda de folículos primordiais nas espécies mamíferas. No entanto, a atresia desses folículos pode ser um evento significativo na determinação do potencial reprodutivo da fêmea (DEPALO et al., 2003).

A apoptose difere de outros tipos de degeneração (como por exemplo a necrose) porque afeta individualmente as células, ocorre condensação do citoplasma e da cromatina e não apresenta reação inflamatória (SVANBERG, 1999). Nesse processo, a superfície das células apoptóticas expressa receptores que podem ser reconhecidos pelas células vizinhas, sendo então rapidamente fagocitadas e os corpos apoptóticos digeridos. A fagocitose ocorre sem extravasamento dos constituintes celulares e sem prejuízo às outras células (ANDERSON,1997).

Desta forma, apesar de ao nascimento o ovário mamífero conter milhares de folículos, a grande maioria torna-se atrésica durante o desenvolvimento e maturação, conseqüentemente um número reduzido de oócitos viáveis são produzidos durante a vida útil da fêmea, fazendo com que o potencial do ovário seja fracamente aproveitado. Diante disso, vários estudos têm sido realizados na tentativa de ser desenvolvido um

meio de cultivo ideal que possa promover a ativação e o crescimento folicular *in vitro*, evitando-se assim as perdas foliculares que ocorrem naturalmente *in vivo*.

2.5. Importância da composição do meio sobre o desenvolvimento de folículos pré-antrais *in vitro*

Várias tentativas visando maximizar o número de folículos pré-antrais viáveis até a ovulação têm sido relatadas. Dentre elas, podemos citar a utilização de várias substâncias adicionadas ao meio de cultivo, tais como água de coco (MARTINS et al., 2005), ácido 3-indol acético (IAA) (ANDRADE et al., 2005), fator de crescimento epidermal (EGF), hormônio folículo-estimulante (FSH) (SILVA et al., 2004c; TAMILMANI et al., 2005; MATOS et al., 2006a) e fator de crescimento fibroblástico (FGF) (MATOS et al., 2006b)

Neste contexto, o estabelecimento de um meio de cultivo ideal é um ponto crucial para a ativação desses folículos *in vitro*, permitindo o desenvolvimento de um grande número de folículos pré-antrais que poderá contribuir para uma melhor compreensão dos diversos fatores implicados na foliculogênese bem como no processo de atresia (FIGUEIREDO et al., 1995). A composição do meio é um importante fator para a obtenção de sucesso durante o cultivo de folículos pré-antrais *in vitro*. Este por sua vez também é uma alternativa para o fornecimento de milhares de oócitos viáveis, inclusos em folículos pré-antrais em diversos estágios de desenvolvimento, para as biotécnicas de fecundação *in vitro* e clonagem (TELFER, 1996).

Estudos descreveram que a sobrevivência dos folículos pré-antrais bovinos *in vitro* foi reduzida na ausência de hipoxantina e substratos energéticos, tais como piruvato e glutamina (FIGUEIREDO et al., 1994). Foi demonstrado também que, a adição de uma mistura de piruvato (0,23 mM), glutamina (2 mM) e hipoxantina ao meio

de cultivo de base denominado Meio Essencial Mínimo – MEM (controle) suplementado com antibióticos: penicilina – 20 UI/mL, estreptomicina – 200 µg/mL, e ITS (insulina – 6,25 µg/mL, transferrina – 6,25 ng/mL e selênio – 6,25 ng/mL) aumentou significativamente a porcentagem de folículos morfológicamente normais (SILVA et al., 2004). Jewgenow et al. (1998) também demonstraram que a adição de piruvato, glutamina e hipoxantina ao MEM é essencial para o crescimento de folículos pré-antrais felinos *in vitro*.

Atualmente, uma outra preocupação por parte de determinadas equipes (TILLY e TILLY, 1995, OTALA et al., 2002) que visam o desenvolvimento de folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano cultivados *in vitro* é a adição ao meio de cultivo de substâncias que controlem a formação de radicais livres produzidos durante as reações metabólicas normais. Estudos mostraram que estes radicais, como por exemplo, o peróxido de oxigênio (H_2O_2), o ânion superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila (OH^\cdot), afetam o equilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes em sistemas biológicos, levando à peroxidação lipídica, (ROMERO et al., 1998). Esta, por sua vez, provoca mudanças na estrutura, composição e propriedades das membranas biológicas. Além disso, pode influenciar também a diferenciação celular, afetando diretamente as células ovarianas (BEHRMAN et al., 2001).

As espécies reativas de oxigênio são geradas dentro do corpo como um subproduto do metabolismo oxidativo normal (CHANDRA et al., 2000), mas podem ser muito danosas devido ao seu papel na inflamação, mutagênese, necrose e depleção de ATP (BEHRMAN et al., 2001). Os efeitos potencialmente danosos dos radicais livres são, contudo, controlados pela ação de antioxidantes intra e extracelulares, os quais contribuem para a função ovariana, incluindo a retomada espontânea da meiose,

maturação oocitária induzida pelas gonadotrofinas (TAKAMI et al., 1999, TAKAMI et al., 2000), regressão do corpo lúteo e ovulação (BEHRMAN et al., 2001).

Em virtude da peroxidação lipídica, é necessário que as células possuam mecanismos que reduzam a formação dos radicais livres ou que os inative quando já produzidos. Entre os fatores que controlam a geração e a ação de radicais livres, estão as substâncias antioxidantes naturais, como a vitamina E (α -tocoferol) e a ternatina, as quais agem impedindo a formação dos radicais ou removendo-os quando já formados (SOUZA et al., 1999).

2.6. α -Tocoferol e Ternatina

A vitamina E foi descoberta em 1922 por Herbert Evans e Katherine Bishop, como um fator oriundo de vegetais, lipossolúvel, que pode prevenir a morte fetal em camundongas, estando portanto relacionada com a fertilidade. É um nutriente essencial, e age como antioxidante no organismo animal (SEN et al., 2006). Hoje, sabe-se que esta vitamina é predominante na membrana plasmática das células animais (WANG et al., 2002; BARROSO et al., 1997) e que quantidades significativas estão presentes no ovário e no fluido folicular (ATTARAN et al., 2000). O termo vitamina E representa um termo genérico para todos os tocoferóis e seus derivados que possuem atividade de tocoferol, ou seja, componentes naturais com atividade semelhante à da vitamina E (TRABER e SIES, 1996). Sabe-se que existem na natureza oito substâncias com esse tipo de atividade: α -, β -, γ - e δ -tocoferol e α -, β -, γ - e δ -tocotrienol, sendo estes últimos as formas primárias da vitamina E (SEN et al., 2006). O α -tocoferol em particular desempenha um importante papel na regulação do processo oxidativo causado pelos radicais livres, sendo a forma mais comum e mais ativa encontrada na natureza (POVALISHEV et al., 2006).

A principal função biológica da vitamina E é proteger os ácidos graxos poliinsaturados das membranas, visto que a peroxidação desses lipídios pode levar a danos estruturais, afetando a função e a permeabilidade destas, resultando em injúrias irreversíveis e morte celular (OLSON e SEIDEL JR, 2000). O α -tocoferol, por sua vez, reage com outros radicais livres de forma muito rápida, evitando assim a propagação desses radicais (DUTTA e DUTTA, 2003). Esta substância inibe a propagação das espécies reativas de oxigênio pela sua própria conversão em um produto oxidado, o radical livre α -tocoferoxil (INGOLD et al.,1987). A forma original do α -tocoferol pode ser regenerada através de sua redução (doação de hidrogênio) pela vitamina C (SCHNEIDER, 2005), aumentando a capacidade antioxidante da vitamina E (TUCKER e TOWNSEND, 2005) e sugerindo o conceito de reciclagem dos antioxidantes. A regeneração do α -tocoferol implica na manutenção da concentração dessa substância na membrana celular (SEN et al., 2006).

Outras substâncias antioxidantes importantes são os flavonóides, os quais são polifenóis naturais, presentes em frutas e vegetais (SADEGHIPOUR et al.,2005). Os efeitos terapêuticos dessas substâncias têm sido descritos para diabetes mellitus (ONG e KHAO, 1997), alergias (INOUE, 2002), câncer (PARK e SURH, 2004) e inflamações (MANTHEY et al.,2001). A ternatina é um bioflavonóide (4'5-diidroxi-3,3'7,8-tetroximetoxiflavona) e devido aos seus efeitos benéficos sobre o organismo, vem sendo intensamente estudada. É oriunda da *Egletes viscosa* L., popularmente conhecida como macela-da-terra ou macela-do-sertão, a qual é uma pequena erva medicinal que cresce abundantemente no Nordeste do Brasil (SOUZA et al.,1998) Estudos químicos-farmacológicos mostraram atividades hepatoprotetora (SOUZA et al., 1998), antianafilática e antiinflamatória (SOUZA et al., 1992), antitrombótica (SOUZA et al.,

1994), antidiarréica e gastroprotetora (RAO et al., 1997), demonstrando a importância desta espécie para a farmacopéia brasileira e mundial.

Souza et al., (1999) trabalhando com a ternatina e o α -tocoferol, mostraram que ambas as substâncias foram inibidores efetivos da peroxidação lipídica induzida pela aflatoxina B1. Esses resultados indicam que tanto a ternatina como o α -tocoferol podem atuar efetivamente como eliminadores de radicais livres, prevenindo assim a apoptose.

No entanto, além da excelente atividade antioxidante demonstrada pelo α -tocoferol e a ternatina, sabe-se que estas substâncias podem, em determinadas situações, agir como pró-oxidantes. Estudos mostraram que alguns flavonóides podem apresentar ação oxidativa dependendo da concentração utilizada (SADEGHIPOUR et al., 2005) e que suas estruturas moleculares podem influenciar sistemas biológicos, induzindo a degradação do DNA (SUGIHARA et al., 2003), crescimento e proliferação de células malignas (AGULLO et al., 1997) e toxicidade aguda em hepatócitos de camundongos (MORIDANI et al., 2002). Semelhantemente, o α -tocoferol pode agir como oxidante na presença de íons Cu^{++} (BURKITT e MILNE, 1996) e no processo de oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (IWATSUKI et al., 1995). Estudos verificaram que o α -tocoferol possui ação antioxidante apenas por um curto período, podendo então reagir rapidamente e formar radicais livres (SEN et al., 2006). Sabe-se também que o α -tocoferol em excesso pode inibir a proliferação celular, efeito que não está relacionado com sua ação antioxidante, possivelmente mostrando interações específicas do α -tocoferol com enzimas, proteínas estruturais, lipídios e fatores transcricionais (ZINGG e AZZI, 2004).

3.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGULLO, G. et al. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. **Biochemical Pharmacology**, v.53, n.11, p.1649-1657, 1997.

AMSTERDAN, A. et al. Steroidogenesis and apoptosis in the mammalian ovary. **Steroids**, v. 68, p.861-867, 2003.

ANDERSON, P. Kinase cascades regulating entry into apoptosis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.61, p.33-46, 1997.

ANDRADE, E.R et al. Interactions of indole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles. **Theriogenology**, v.64, p. 1104-1113, 2005.

ATTARAN, M. et al. The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of *in vitro* fertilization. **International Journal of Fertility**, v.45, p.314-320, 2000

BARROSO, M.P. et al. Ascorbate and α -Tocopherol preven apoptosis induced by serum removal independent of Bcl-2. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.343, p.243-248, 1997.

BEHRMAN, H.R. et al. Oxidative stress and the ovary. **Journal of Society for Gynecology Investigation**, v. 8, p.40-42, 2001.

BRAW-TAL, R. The initiation of follicle growth: the oocyte or the somatic cells? **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.187, p.11-18, 2002.

BRAW-TAL, R.; YOSSEFI, S. Studies *in vivo* and *in vitro* on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 109, p. 165-171, 1997.

BUKOVSKY, A. et al. Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.2, n.20, p.1-30, 2004.

BURKITT, M.J.; MILNE, L. Hydroxyl radical formation from Cu(II)-Trolox mixtures: insights into the pro-oxidant properties of α -tocopherol. **FEBS Letters**, v.379, p.51-54, 1996.

BUTCHER, L.; ULLMANN, S.L. Culture of preantral ovarian follicles in the grey, short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. **Reproduction, Fertility and Development.**, v. 8, p. 535-539, 1996.

CARROLL, J. et al. Extraovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, p. 321-327, 1990.

CARROL, J.; WHITTINGHAN, D.G.; WOOD, M.J. Growth in vitro and acquisition of meiotic competence after the cryopreservation of isolated mouse primary ovarian follicles. **Reproduction, Fertility and Development.**, v.3, p.593-599, 1991.

CECCONI, S. et al. *In vitro* development of sheep preantral follicles. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 594-601, 1999.

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

DEPALO, R. et al. Evidence of apoptosis in human primordial and primary follicles. **Human Reproduction**, v.18, p. 2678-2682, 2003.

DUTTA, A.; DUTTA S.K. Vitamin E and its role in the prevention of atherosclerosis and carcinogenesis: a review. **Journal of American College of Nutrition**, v.22, p.258-268, 2003.

EARLE, K.E. Nutrientes antioxidantes: seu papel em uma dieta saudável. **Suplemento Temas de Veterinária**, v.3, p.3-9, 2001.

EPPIG, J.J. Mouse oocyte development *in vitro* with various culture systems. **Developmental Biology**, v.60, p.371-378, 1997.

EPPIG, J.J. e O'BRIEN, M.J. Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. **Biology of Reproduction**, 54:197-207, 1996.

FIGUEIREDO, J.R. et al. Preservation of oocyte and granulosa cell morphology in bovine preantral follicles cultured *in vitro*. **Theriogenology**, v. 41. p. 1333-1346, 1994.

FIGUEIREDO, J.R. et al. Extracellular matrix proteins and basement membrane: their identification in bovine ovaries and significance for the attachment of cultured preantral follicles. **Theriogenology**, v. 43, p. 845-858, 1995.

FORTUNE, J.E. et al. Activation of bovine and baboon primordial follicles *in vitro*. **Theriogenology**, v. 49, p. 441-449, 1998.

FORTUNE, J.E. et al. The primordial to primary follicle transition. **Molecular and Cellular Endocrinology** v.163, p. 53-60, 2000.

GLAMOCLJA, V. et al. Apoptosis and active caspase-3 expression in human granulosa cells. **Fertility and Sterility** v. 83, n. 2, p. 426-431, 2005.

GUTIERREZ, C.G. et al. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 1322-1328, 2000.

HAFEZ, E.S.E. Anatomy of Female Reproduction. In: HAFEZ, E.S.E. **Reproduction in Farm Animals**, 7nd. Edition Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 20-58.

HIRAO, Y. et al. *In vitro* growth and maturation of pig oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 100, p.333-339, 1994.

HIRSHFIELD, A. N. Size frequency analysis of atresia in cycling rats. **Biology of Reproduction**, v. 38, p. 1181-88, 1988.

HIRSHFIELD, A.N. Development of follicles in the mammalian ovary. **International Review of Cytology**, v. 124, p. 43-101, 1991.

HUAMNIN, Z.;YONG, Z. In vitro development of caprine ovarian preantral follicles. **Theriogenology**, v. 54, p. 641-650, 2000.

INGOLD, K.U. et al. Vitamin E remains the major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human plasma even in individuals suffering severe vitamin E deficiency. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.259, p.224-225, 1987.

INOUE, T. et al. Antiallergic effect of flavonoid glycosides obtained from *Mentha piperita* L. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.25, n.2, p.256-259, 2002.

IWATSUKI, M. et al. α -Tocopherol mediated peroxidation in the copper (II) and met myoglobininduced oxidation of human low density lipoprotein: The influence of lipid hydroperoxides. **FEBS Letters**, v.360, p.271-276, 1995.

JEWGENOW, K. et al. Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.112, p.39-47, 1998.

JEWGENOW, K.; GÖRITZ, F. The recovery of preantral follicles from ovaries of domestic cats and their characterisation before and after culture. **Animal Reproduction Science**, v.39, p. 285-297, 1995.

JEWGENOW, K.; PITRA, C. Hormone-Controlled Culture of Secondary Follicles of Domestic Cats. **Theriogenology**, v. 39, p. 527-535, 1993.

JEWGENOW, K.N.; STOLTE, M. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats - viability and ultrastructural investigations. **Animal Reproduction Science**, v.44, p.183-193, 1996.

JOHNSON, J. et al. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. **Cell**, v.122, p.303-315, 2005.

KERR, J.F.R. et al. Anatomical methods in cell death. In: **Cell Death**, Ed. Schwartz, L. & Osborne, B.A., p.459, 1995.

LIU, J. et al. Live offspring by *in vitro* oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential *in vivo* transplantation and *in vitro* maturation. **Biology of Reproduction**, v.64, p.171-178, 2001.

LUSSIER, J.G.; MATTON, P.; DUFOUR, J.J.; Growth rates of follicles in the ovary of the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.81, p.301-307, 1987.

MANTHEY, J.A.; GROHMANN, K.; GUTHRIE, N. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. **Current Medicinal Chemistry**, v.8, n.2, p.135-153, 2001.

MARTINS, F.S. et al. Development of goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian tissue in Minimal Essential Medium supplemented with coconut water. **Animal Reproduction**, v.2, p.106-113, 2005.

MATOS, M.H.T. **Análise morfológica e ultraestrutural de folículos primordiais ovinos conservados em solução salina 0,9% e TCM 199**. Fortaleza, 2003. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias-Universidade Estadual do Ceará.

MATOS, M.H.T. et al. Influência de diferentes concentrações de FSH sobre o desenvolvimento de folículos primordiais caprinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, p.266, 2006.

MATOS, M.H.T. et al. Efeitos do fator de crescimento fibroblástico-2 sobre o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, p.265, 2006.

McCAFFERY, F.H. et al. Culture of Bovine Preantral Follicles in a Serum-Free System: Markers for Assessment of Growth and Development. **Biology of Reproduction**, v.63, p.267-273, 2000.

MIKKELSEN, A.L.; HOSTAND, E.; LINDENBERG, S. Incidence of apoptosis in granulose cells from immature human follicles. **Reproduction**, v.122, p.481-486, 2001.

MORIDANI, M.Y.; GALATI, G.; O'BRIEN, P.J. Comparative quantitative structure toxicity relationships for flavonoids evaluated in isolated rat hepatocytes and HeLa tumor cells. **Chemistry and Biological Interactions**, v.193, n.3, p.251-264, 2002.

MORITA, Y.; TILLY, J. L. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. **Developmental Biology**, v.213, p.1-17, 1999.

NAYUDU, P.L.; OSBORN, S.M. Factors influencing the rate of preantral and antral growth of mouse ovarian follicles *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.95, p.349-362, 1992.

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

OLSON, S.E.; SEIDEL JR, G.E. Culture of *in vitro*-produced bovine embryos with vitamin E improves development *in vitro* and after transfer to recipients. **Biology of Reproduction**, v.62, p.248-252, 2000.

ONG, K.C.; KHAO, H.E. Biological effects of myricetin. **Gen Pharmacol**, v.29, n.2, p.121-126, 1997.

OTALA, M. et al. Cell death and its suppression in human ovarian tissue culture. **Molecular Human Reproduction**, v.8, p.228-236, 2002.

PARK, O.J.; SURH, V.J. Chemopreventive potential of epigallocatechin gallate and genistein: evidence from epidemiological and laboratory studies. **Toxicology Letters**, v.150, n.1, p.43-56, 2004.

POVALISHEV, V.N.; POLOZOV, G.I.; SHADYRO, O.I. Effects of α -tocopherol and related compounds on reactions involving various organic radicals. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.16, p.1236-1239, 2006.

QVIST, R. et al. Development of Mouse Ovarian Follicles from Primary to Ovulatory Stages in Vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.89, p.169-180, 1990.

RAO, V.N.S. et al. Investigations on the gastroprotective and antidiarrhoeal properties of ternatin, a tetramethoxyflavone from *Egletes viscosa*. **Planta Medica**, v. 63, p.146-149, 1997.

ROMERO, F.J. et al. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. **Environmental Health Perspective**, v.106, p.1229-1234, 1998.

ROY, S.K.; TREACY, B.J. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. **Fertility and Sterility**, v. 59, p.783-790, 1993.

SADEGHIPOUR, M.; TERREUX, R.; PHIPPS, J. Flavonoids and tyrosine nitration: structure-activity relationship correlation with enthalpy of formation. **Toxicology in vitro**, v.19, p. 155-165, 2005.

SAUMANDE, J. La folliculogénèse chez les ruminants. **Recherche Vétérinaire**, v.167, p.205-218, 1991.

SCHNEIDER, C. Chemistry and biology of vitamin E. **Molecular Nutrients and Food Research**, v.49, p.7-30, 2005.

SEN, C.K.; KHANNA, S.; ROY, S. Tocotrienols: vitamin E beyond tocopherols. **Life Sciences**, v.78, p.2026-2032, 2006.

SILVA J.R.V. et al. Expression of growth differentiation factor 9 (GDF9), bone morphogenetic protein 15 (BMP15) and BMP receptors in goat ovaries. **Molecular Reproduction and Development**, v.70, p.11-19, 2004a.

SILVA J.R.V. et al. Gene expression and protein localisation for activin-a, follistatin and activin receptors in goat ovaries. **Journal of Endocrinology**, v.183, p.405-415, 2004b.

SILVA, J.R.V. et al. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue. **Theriogenology**, v.61, p.1691-1704, 2004c.

SILVA J.R.V.. Growth factors in goat ovaries and the role of activin-A in the development of early-staged follicles. 2005. **PhD Thesis, Utrecht University, The Netherlands**.

SILVA J.R.V., van den HURK, R., FIGUEIREDO, J. R. Expression of mRNA and Protein Localization for Epidermal Growth Factor and its Receptor in Goat Ovaries. **Zygote**, 2006. (in press).

SOUZA, M.F.; RAO, V.S.N.; SILVEIRA, E.R. Antianaphylactic and antiinflammatory effects of ternatin, a flavonoid isolated from *Egletes viscosa* Less. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**, v.25, n.10, p.1029-1032, 1992.

SOUZA, M.F. et al. Antithrombotic activity of ternatin, a tetramethoxyflavone from *Egletes viscosa* Less. **Phytotherapy Research**, v.8, n.8, p.478-481, 1994.

SOUZA, M.F.; RAO, V.S.N.; SILVEIRA, E.R. Prevention of acetaminophen-induced hepatotoxicity by ternatina, a bioflavonoid from *Egletes viscosa* Less. **Phytotherapy Research**, v.12, n.8, p.557-561, 1998.

SOUZA M.F., TOMÉ, A.R., RAO, V.S.N. Inhibition by the bioflavonoid ternatin of aflatoxin B1-induced lipid peroxidation in rat liver. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.51, p.125-129, 1999.

SUGIHARA, N.; KANEKO, A.; FURUNO, K. Oxidation of flavonoids wich promote DNA degradation induced by bleomycin-Fe complex. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.26, n.8, p.1108-1114, 2003.

SVANBERG, B. **Apoptosis – the cellular mechanism of rat ovarian follicular atresia**. Tese de Doutorado, Göteborgs Universitet, Suécia, 1999.

TAKAMI, M. et al. Antioxidants reversibly inhibit the spontaneous resumption of meiosis. **Physiology - Cell Physiology**., v.276, p.684-688, 1999.

TAKAMI, M., PRESTON, S.L., BEHRMAN, H.R. Eicosatetraynoic and eicosatriynoic acids, lipoxygenase innibitors, block meiosis via antioxidant action. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 278, p.646-650, 2000.

TAMILMANI, G. et al. Nuclear maturation of ovine oocytes in cultured preantral follicles. **Small Ruminant Research**, v.60, p.295-305, 2005.

TELFER, E.E. The Development of Methods for Isolation and Culture of Preantral Follicles from Bovine and Porcine Ovaries. **Theriogenology**, v. 45, p. 101-110, 1996.

TILLY, J.L.; TILLY, K.I. Innibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormones to supress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. **Endocrinology**, v.136, p.242-252, 1995.

TRABER, M.G.; SIES, H. Vitamin E in humans: demand and delivery. **Annual Review of Nutrition**, v.16, p.321-347, 1996.

TUCKER, J.M.; TOWNSEND, D.M. Alpha-tocopherol: roles in prevention and therapy of human disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.59, p.380-387, 2005.

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

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

WANDJI, S.A.; EPPIG, J.J.; FORTUNE, J.E. FSH and growth factor affect the growth and endocrine function *in vitro* of granulosa cells of bovine preantral follicles. **Theriogenology**, v. 45, p. 817-832, 1996.

WANG, X. et al. Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. **Fertility and Sterility**, v. 78, p.1272-1277, 2002.

WU, J.; BENJAMIN, R.E.; CARRELL, D.T. *In vitro* growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. **Biology of Reproduction**, v.64, p.375-381, 2001.

YU, Y.S. et al. Serum and follicular fluid steroid levels as related to follicular development and granulosa cells apoptosis during the estrous cycle of goats. **Small Ruminant Research**, v. 57, p.57-65, 2005.

ZING, J.M.; AZZI, A. Non-antioxidant activities of vitamin E. **Current Medicinal Chemistry**, v.11, n.9, p.1113-1133, 2004.

4.PUBLICAÇÕES

Influence of α -tocopherol and ternatin on morphology and activation of goat preantral follicles cultured *in vitro*

I.B.Lima-Verde^{1*}, F.S.Martins², M.H.T. Matos², J.B.Bruno², R.R. Santos², S.N. Bao³,
M.C.A. Luque³, G.A.B. Vieira⁴, E.R. Silveira⁴, A.P.R. Rodrigues², J.R. Figueiredo²,
M.A.L. Oliveira¹, P.F. Lima¹

¹Faculty of Veterinary Medicine, PPGCV, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

²Faculty of Veterinary Medicine, PPGCV, State University of Ceara, Fortaleza, CE, Brazil

³Laboratory of Electron Microscopy, Department of Cell Biology, University of Brasilia, Brasilia, DF, Brazil

⁴Federal University of Ceara, CENAUREM, Fortaleza, CE, Brazil

*Corresponding address:

Programa de Pós-Graduaao em Ciências Veterinárias

Faculdade de Veterinária

Laboratório de Manipulaao de Oócitos e Folículos Pré-Antrais

Universidade Estadual do Ceará-UECE

Av. Paranjana, 1700 – Campus do Itaperi

60740-000 Fortaleza-CE-Brazil

Tel.: +55.85.3101.9852; Fax: +55.85.3101.9860

E-mail address: isabel_limaverde@yahoo.com.br (I.B.Lima-Verde)

Article type: Biotechnology

1. Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of α -tocopherol and ternatin on the morphology and activation of goat preantral follicles after *in vitro* culture. The ovarian cortex was divided into small pieces and one fragment was immediately fixed (control). The remaining fragments were *in vitro* cultured for 1 or 5 days at 39°C and 5% CO₂, in Minimum Essential Medium (MEM) supplemented and added or not by 5, 10 or 15 μ M of α -tocopherol or ternatin. Control and cultured ovarian fragments were fixed in 10% formaline or in 2% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1M sodium cacodylate buffer for histological and ultrastructural analysis, respectively. Follicles were classified as primordial or developing, as well as normal or degenerated. When compared with control, *in vitro* culture led to a decrease in the percentages of morphologically normal preantral follicles in all treatments with α -tocopherol or ternatin ($P < 0.05$) after 5-days culture. Furthermore, when compared with control, culture of ovarian cortex for 5 days increased the percentages of follicular activation in all treatments ($P < 0.05$). In comparison with MEM alone, addition of α -tocopherol or ternatin in the culture medium did not affect follicular activation ($P > 0.05$), except at day 1 of culture, when concentrations of 5 and 15 μ M were used respectively and showed a significantly increase of follicular activation, in comparison with others treatments. Ultrastructural analysis showed that follicles cultured for 5 days in medium containing antioxidants were degenerated. This degeneration did not occur in follicles treated with MEM alone or control, which maintained their ultrastructural integrity. In conclusion, this study demonstrated that α -tocopherol and ternatin can promote follicular activation, however the addition of antioxidants in the tested concentrations reduced the follicular viability after *in vitro* culture.

Keywords: α -tocopherol, ternatin, caprine, preantral follicles.

2.Introduction

The ovarian follicle consists in the structural and functional unit (McGee et al., 1997) of the mammalian ovary, formed by an oocyte surrounded by granulosa cells, basal membrane and, according to their developing stage, theca cells adjacent to basal membrane (Kagawa et al., 2005). Furthermore, most of the follicles (90%) present in the ovary are found in the preantral phase (Saumande, 1991). However, during female lifespan, the vast majority is lost by atresia (Svanberg, 1999; Mikkelsen et al., 2001), and a limited number (approximately 0.01%) of follicles develops until the preovulatory stage,

Although follicular atresia occurs naturally *in vivo*, during whole female reproductive life, as well as during *in vitro* culture, the complete mechanism responsible for this process is still unknown (Silva et al., 2004). Many researchers have been suggested that atresia can follow the apoptosis pathway (Svanberg, 1999; Depalo et al., 2003). Apoptosis is a physiological process (Nakahara et al., 1997), essential to maintain homeostasis (Amsterdan et al., 2003) and can occur as a consequence of different factors, like oxidative stress (Earle, 2001), which can be explained by the excessive production of reactive oxygen species (Bedaiwy et al., 2004), called ROS.

Many *in vitro* studies have showed the importance of adding antioxidant substances in the culture medium of preantral follicles (Tilly and Tilly, 1995; Ojala et al., 2002). ROS can affect the equilibrium between pro- and anti-oxidant factors in a biological system, leading to a lipidic peroxidation (Romero et al., 1998) and, consequently, cell death. Among the factors controlling ROS generation and action, it is possible include vitamin E (α -tocopherol) and ternatin, which act obstructing generation of free radicals or removing them when formed (Souza et al., 1999).

The most important biological function of α -tocopherol is to protect cell membrane from lipidic peroxidation, avoiding irreversible damages and cellular death (Olson and Seidel Jr., 2000). With regard to ternatin, a bioflavonoid present in macela-da-terra (*Egletes viscosa*), it offers hepatic (Souza et al., 1998), gastric (Rao et al., 1997), anti-anaphilactic and anti-inflammatory (Souza et al., 1992) protection, also presenting antioxidant activity (Souza et al., 1999). Thus, since oxidative stress can be one of the factors involved in follicular atresia, the use of antioxidants may contribute for the success of cellular *in vitro* culture. However, the effects of α -tocopherol and ternatin on *in vitro* culture of caprine preantral follicles are unknown.

The aim of this study was to evaluate through histological and ultrastructural analysis the effects of α -tocopherol and ternatin on morphology, activation and growth of goat preantral follicles *in vitro* cultured.

3. Material and Methods

3.1. Source and transport of ovarian tissue

Ovaries ($n = 6$) from adult mixed breed goat were obtained at a local slaughterhouse (Fortaleza, Ceará, Brazil). The ovaries were trimmed of adhering tissue, washed in 70% alcohol and then, twice in 0.9% saline solution. The ovaries were put into tubes containing 10 ml of 0.9% saline solution supplemented with antibiotics and transported to the laboratory within 1h in a thermosflask filled with water at 37 °C.

3.2. Medium and culture conditions

Each ovarian pair was divided into 15 fragments of 3 x 3 x 1 mm. One fragment was immediately fixed in 10% formalin for 12 h and the remaining fragments were *in vitro* cultured for 1 or 5 days in twenty four-well culture dishes (Biossystems) containing 1 ml of culture medium. Culture medium consisted of MEM (Cultilab, Rio de Janeiro, Brazil) supplemented with antibiotics (100 μ g/ml of penicillin, 100 μ g/ml of

streptomycin) (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil), 0.25 µg/ml anphotericin B, BSA (0.0014g/ml bovine serum albumine), ITS (insulin 5 µg/ml, transferin 5.5 µg/ml and selenium 5 ηg/ml), 0.23 mM pyruvate, 2 mM glutamine and 2 mM hypoxanthine), added or not by α-tocopherol (DL-α-tocopherol - TOC) or ternatin (TER - obtained from Dr. Edilberto Silveira – Federal Ceara University), both diluted in 95% alcohol according to Tao et al. (2004) and at final concentration of 5, 10 or 15 µM. Unless indicated, reagents were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Fresh medium was replaced every 48 hours. A minimum of 50 follicles were counted in each repetition (150 per treatment), being evaluated a total of 2,250 evaluated preantral follicles.

3.3. Histological procedure

After fixation in 10% formalin for 12 h, ovarian fragments were dehydrated in ethanol, clarified with xylene and embedded in paraffin wax. Serial sections (7 µm) of ovarian tissue were cut and every fifth section was mounted on glass slides and stained with periodic acid Schiff (PAS)-hematoxylin (PAS staining system, Sigma, Inc., St. Louis, MO, EUA). All sections were examined using a light microscope (Zeiss, Germany) at 100 and 400X magnifications. Preantral follicles were defined as follicles with an oocyte surrounded either by one flattened (primordial follicles) and/or cuboidal layer or several layers of only cuboidal granulosa cells (developing follicles). To avoid counting a follicle more than once, preantral follicles were counted only in the sections where their oocyte nucleus was observed. Follicular quality was evaluated based on the morphological integrity of the oocyte and granulosa cells. Preantral follicles were also classified as (i) histologically/morphologically normal when they contained an intact oocyte and intact granulosa cells and (ii) degenerated when their oocyte nucleus had become pycnotic, the oocyte was shrunken and when possibly granulosa cells had

detached from the basement membrane and have enlarged in volume. To evaluate follicular activation, the number of primordial and developing follicles was counted before and after *in vitro* culture.

3.4. Ultrastructural analysis

Tissue fragments with a maximum dimension of 1 mm³ were fixed in 2% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1M sodium cacodylate buffer (pH 7.2). After fixation, specimens were post-fixed in 1% osmium tetroxide, 0.8% potassium ferricyanide and 5mM calcium chloride in 0.1M sodium cacodylate buffer for 1 h. Subsequently, the samples were dehydrated through a gradient of acetone solutions (30–100%) and the tissues were embedded in Spurr. Semi-thin sections (3 µm) were stained with toluidine blue. The ultra-thin sections (60–70 nm) were contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and examined under a Jeol JEM 100C transmission electron microscope. At ultrastructural evaluation, were observed cytoplasmic organelles and basement membrane integrity, as well as the presence of vacuolization.

3.5. Statistical analysis

All treatment data from 2,250 preantral follicles were analysed using a factorial design (medium effects: MEM x TOC x TER and concentration: 5 x 10 x 15 µM) in an ANOVA test. The data were compared using Bonferroni test. The comparison of the percentage of morphologically normal and developing preantral follicles as well as follicular diameter in treatments in relation to the control was analyzed by a Chi-square test. Values were considered statistically significant when $P < 0.05$.

4. Results

4.1. Histological assessment

At histological sections, goat preantral follicles appeared morphologically normal when oocyte was spherical or slightly elongated, with a central nuclei and,

sometimes, with a visible nucleoli. Granulosa cells were well distributed around the oocyte. Regarding to degenerating follicles, it was observed piknotic oocyte nuclei, cytoplasmic retraction, swelling and disorganized granulosa cells around oocyte (Fig.1).

4.2. Effects of α -tocopherol and ternatin on the follicular morphology

The percentages of morphologically normal preantral follicles in non-cultured ovarian tissue (control) and cultured for 1 or 5 days are showed in table 1. *In vitro* culture leads to a decrease on the percentages of morphologically normal preantral follicles in all treatments ($P<0.05$) when compared with control.

The addition of 10 μM α -tocopherol at day 1 of culture and 15 μM α -tocopherol or ternatin at days 1 or 5 of culture significantly reduced the percentage of morphologically normal preantral follicles ($P<0.05$) when compared with MEM alone. When the antioxidants were compared at the same concentration, at day 1 of culture the percentage of normal preantral follicles was significantly higher ($P<0.05$) in ternatin when compared with α -tocopherol, both at 10 μM .

Independently of the treatment no effects of culture period (1 or 5 days) on the rates of morphologically normal preantral follicles was observed.

4.3. Effects of α -tocopherol and ternatin on the follicular activation and diameter

The figure 2 shows the percentages of developing follicles in non-cultured ovarian tissue (control) and cultured for 1 or 5 days. *In vitro* culture leads to a significant increase on the percentage of developing follicles when compared to control. In regard to MEM alone, addition of antioxidants to the culture medium did not affect follicular activation ($P>0.05$), except at day 1 of culture when 5 μM α -tocopherol and 15 μM ternatin were used. At day 5 of culture, MEM alone and MEM supplemented

with 10 μM ternatin significantly increased ($P<0.05$) follicular activation when compared to the others treatments.

The figure 3 shows follicular diameter in non-cultured and *in vitro* cultured ovarian cortex for 1 or 5 days. When compared with control, only at day 1 of culture, a significantly decrease ($P<0.05$) in the follicular diameter was observed when 15 μM α -tocopherol was used.

4.4. Ultrastructural analysis

For a better evaluation of the follicular morphology, ultrastructural studies were carried out on fragments of control (non-cultured) and those *in vitro* cultured in MEM alone and in presence of α -tocopherol 5 μM and ternatin 5 or 10 μM , which appeared the best in maintaining the histological image of the follicles. Ultrastructural analysis was performed only for goat preantral follicles that were considered normal in semi-thin sections stained with toluidine blue. In normal preantral follicles from control (non-cultured) and cultured in MEM alone were observed oocytes with a well-delimited nucleus. Furthermore these follicles exhibit some vesicles spread throughout the ooplasm. It was not observed completely condensed chromatin and oocyte as well nuclei outlines were regular. Regarding to 5 μM α -tocopherol and 5 or 10 μM ternatin, follicles cultured in presence of these substances presented highly vacuolated cytoplasm, detached granulosa cells, nuclear and basal membrane damaged and condensed chromatin at granulosa cells and oocyte (Fig. 4, 5 and 6)

5. Discussion

Progression of growth and differentiation of preantral follicles in the ovary is a crucial point for the success of reproduction (McGee et al., 1999). On the other hand, it is known that mechanisms and factors involved in the early folliculogenesis regulation and follicular atresia are not well understood. In the present study, caprine preantral

follicles in ovarian cortical tissue were *in vitro* cultured for up to 5 days in the presence of antioxidant substances to verify their effects on follicular viability and development.

Normal and degenerated preantral follicles were observed in non-cultured ovarian tissue and in tissue cultured for 1 or 5 days in the different treatments. Light microscopical analysis showed normal preantral follicles with well-organized granulosa cells. Degenerated follicles showed disorganized granulosa cells, retracted oocyte and/or nuclear pyknosis. Ojala et al. (2002) reported the same changes in human ovarian tissue cultured for 8, 24 and 48 h with the antioxidant N-acetylcysteine. Similar findings were also observed after *in vitro* culture of preantral follicles (ovine: Andrade et al., 2005; caprine: Silva et al., 2004; murine: Nilsson and Skinner, 2004). In regard to ultrastructural findings, degenerated preantral follicles were observed, i.e. exhibiting disorganized granulosa cells, nucleus with condensed chromatin, nuclear outlines and basement membrane damaged in all treatments with α -tocopherol and tert-butylhydroquinone after 5 days of culture. These changes were not observed in non-cultured preantral follicles as well as in those cultured with MEM only. The ultrastructural changes in this study were similar to the signs of apoptosis in fresh (De Pol et al., 1997) and *in vitro* cultured (Ojala et al., 2002) human preantral follicles.

With regard to the percentage of follicles that underwent atresia during *in vitro* culture, in this study, it was observed a significant reduction in the percentage of morphologically normal preantral follicles since the first day of culture in all treatments with antioxidants, regardless of the medium used. In both culture periods (1 or 5 days), it was observed that the culture with MEM alone and the addition of 5 μ M of α -tocopherol or tert-butylhydroquinone resulted in a higher percentage of normal follicles when compared to other treatments using antioxidants. Recently, some *in vitro* studies have showed the importance of antioxidants addition in cellular culture (Tao et al., 2004; Murray et al.,

2001) to reduce the injuries that normally occurs due to the production of oxygen reactive species (ROS) from normal cellular metabolic reaction. It is known that free radicals, for instance, hydrogen peroxide (HO_2^\bullet), superoxide anion (O_2^-) and hydroxyl radical (OH), are responsible for lipidic peroxidation of poliinsaturated fatty acid of cellular membranes (Povalishev et al., 2006), leading to injuries and cellular death. Antioxidants, such as α -tocopherol and ternatin, have been used successfully to reduce these deleterious changes. Olson and Seidel Jr. (2000) reported that addition of 100 μM de α -tocopherol in the *in vitro* culture of bovine embryos resulted in a higher number of blastocysts and embryos when compared to control (without antioxidant). Tao et al. (2004) observed that 10 μM α -tocopherol diminished cumulus cell DNA fragmentation and promoted oocyte development up to metaphase II. With regard to ternatin, Souza et al. (1999) verified that this substance inhibits lipidic peroxidation and affords protections against liver damage induced by aflatoxin B1. *In vivo*, Nugent et al. (1998) demonstrated that the antioxidant treatment using 5 mg of α -tocopherol subcutaneous once/day during 7 days improved the survival of human follicles in ovarian grafts by reduction of ischemic injury.

In this work, the addition of antioxidants to the culture medium did not improve follicular viability. The differences between our results from the other authors may be due to type of substance used for dilution of antioxidants, as well as their concentrations and presence of others antioxidants (transferin and selenium) in the culture medium. Some authors (Kusakabe and Kamiguchi, 2004) showed that dimetilsulphoxyde may be utilized for dilution without damage in cell culture. However, in this work was used ethanol 95% based in satisfactory results obtained in *in vitro* culture of embryos in different species (murine: Tsujii et al., 2002; bovine: Olson and Seidel Jr., 2000) and in porcine oocytes (Tao et al., 2004). Another factor to be considered is that antioxidant

may act as a pro-oxidant in high concentrations after a certain period and that α -tocopherol has an antioxidant action for a short period of time, then rapidly reacting with oxidant species and forming free radicals (Sen et al., 2006). Others authors also showed that some flavonoids can have oxidative action depending on the concentration used (Sadeghipour et al., 2005). In addition, in this study we utilized transferrin and selenium, which may act such as antioxidant in the culture medium and probably increasing pro-oxidants properties of these substances. Based on that, we suggest that the concentrations (5, 10 e 15 μ M) of both antioxidants substances used in this study may not be ideal for the *in vitro* culture of caprine preantral follicles, although 10 μ M α -tocopherol were used for *in vitro* culture of porcine oocytes and granulosa cells (Tao et al., 2004).

The present study showed that caprine preantral follicles might be activated since the first day of culture in the presence of different concentrations of ternatin and α -tocopherol. These results are in accordance with many studies in which preantral follicles were cultivated in the presence of relaxin in humans (Shirota et al., 2005), epidermal growth factor (EGF), 3-indol-acetic acid (IAA) and follicle stimulating hormone (FSH) in ovine (Andrade et al., 2005), kit-ligand (KL) and fibroblast growth factor (FGF) in mouse (Nilsson and Skinner, 2004) and coconut water in caprine (Silva et al., 2004; Martins et al., 2005). In regard to follicular growth, in both culture period, all treatments were similar when compared to control and among them, except follicles cultured with 15 μ M α -tocopherol, which showed a reduction of follicular diameter after 1 day culture. These results can be due an onset of degeneration, which was not perceptible at histological evaluation.

In conclusion, this study demonstrated that α -tocopherol and ternatin can promote follicular activation, however the addition of antioxidants in the tested

concentrations reduced the follicular viability after *in vitro* culture. This suggests that further studies are necessary to find optimal concentrations of α -tocopherol and ternatin for *in vitro* culture of preantral follicles and to provide more accurate information about antioxidants action on the regulation of atresia and preantral folliculogenesis.

6. Acknowledgements

This work was supported by Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa (FUNCAP).

Isabel Bezerra Lima-Verde is a recipient of a grant from this institution. The authors also thank Dr. José Roberto Viana Silva, for suggestions.

7. References

Amsterdam A, Keren-Tal I, Aharoni D, Dantes A, Land-Bracha A, Rimon E, Sasson R, Hirsh L. 2003. Steroidogenesis and apoptosis in the mammalian ovary. *Steroids*, 68: 861-867.

Andrade ER, Seneda MM, Alfieri AA, Oliveira JA, Bracarense APFRL, Figueiredo JR, Toniolli R. 2005. Interactions of indole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles. *Theriogenology*, 64: 1104-1113.

Bedaiwy MA, Falcone T, Mohamed MS, Aleem AAN, Sharma RK, Worley SE, Thomson J, Agarwal A. 2004. Differential growth of human embryos *in vitro*: role of reactive oxygen species. *Fertility and Sterility*, 82:593-600.

De Pol A, Vaccina F, Forabosco A, Cavazzuti E, Marzona L. 1997. Apoptosis of germ cells during preantral oogenesis. *Human Reproduction*, 12: 2235-2241.

Depalo R, Nappi L, Loverro G, Bettocchi S, Caruso ML, Valentini AM, Selvaggi L. 2003. Evidence of apoptosis in human primordial and primary follicles. *Human Reproduction*, 18: 2678-2682.

Earle, KE. 2001. Nutrientes antioxidantes: seu papel em uma dieta saudável. *Temas de Veterinária*, 3: 3-9.

Kagawa N, Kuwayama M, Miyano T, Manabe N. 2005. Growth and maturation of follicles and oocytes following xenotransplantation of porcine ovarian tissues and in vitro maturation. *Journal of Reproduction and Development*, 51:741-748.

Kusakabe H, Kamiguchi Y. 2004. Ability to activate oocytes and chromosome integrity of mouse spermatozoa preserved in EGTA Tris-HCl buffered solution supplemented with antioxidants. *Theriogenology*, 62:897-905.

Martins FS Van Den Hurk R, Santos RR, Silva JRV, Matos MHT, Celestino JJH, Rodrigues APR, Pessoa C, Ferreira FVA, Figueiredo JR. 2005. Development of goat primordial follicles after in vitro culture of ovarian tissue in Minimal Essential Medium supplemented with coconut water. *Animal Reproduction*, 2:106-113.

McGee EA, Perlas E, Lapolt PS, Tsafiriri A, Hsueh AJ. 1997. Follicle-stimulating hormone enhances the development of preantral follicles in juvenile rats. *Biology of Reproduction*, 57:990-998.

McGee EA, Chun SY, Lai S, He Y, Hsueh AJ. 1999. Keratinocyte growth factor promotes the survival, growth, and differentiation of preantral ovarian follicles. *Fertility and Sterility*, 71:732-738.

Mikkelsen AL, Hostand E, Lindenberg S. 2001. Incidence of apoptosis in granulosa cells from immature human follicles. *Reproduction*, 122:481-486.

Murray AA, Molinek MD, Baker SJ, Kojima FN, Smith MF, Hillier SG, Spears N. 2001. Role of ascorbic acid in promoting follicle integrity and survival in intact mouse ovarian follicles *in vitro*. *Reproduction*, 121:89-96.

Nakahara T, Ishii K, Tanaka Y, Nakayama K. 1997. Flow-dependent regulation of nitric oxide formation in the isolated canine mesenteric arterial bed. *Japanese Journal of Pharmacology*, 74:275-280,

Nilsson EE, Skinner MK. 2004. Kit ligand and basic fibroblastic growth factor interaction in the induction of ovarian primordial to primary follicle transition. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 214:19-25.

Nugent D, Newton H, Gallivan L, Gosden RG. 1998. Protective effect of vitamin E on ischaemia-reperfusion injury in ovarian grafts. *Journal of Reproduction Fertility*, 114:341-346.

Olson SE, Seidel Jr GE. 2000. Culture of *in vitro*-produced bovine embryos with vitamin E improves development *in vitro* and after transfer to recipients. *Biology of Reproduction*, 62:248-252.

Otala M, Erkkila K, Tuuri T, Sjoberg J, Suomalainen L, Suikkari AM, Pentikainen V, Dunkel L. 2002. Cell death and its suppression in human ovarian tissue culture. *Molecular Human Reproduction*, 8:228-236.

Povalishev VN, Polozov GI, Shadyro OI. 2006. Effects of α -tocopherol and related compounds on reactions involving various organic radicals. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16:1236-1239.

Rao VNS, Santos FA, Sobreira TT, Souza MF, Melo CL, Silveira ER. 1997. Investigations on the gastroprotective and antidiarrhoeal properties of ternatin, a tetramethoxyflavone from *Egletes viscosa*. *Planta Medica*, 63: 146-149.

Romero FJ, Bosch-Morell F, Romero MJ, Jareño EJ, Romero B, Marín N, Romá J. 1998. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environmental Health Perspectives*, 106:1229-1234.

Sadeghipour M, Terreux R, Phipps J. 2005. Flavonoids and tyrosine nitration: structure-activity relationship correlation with enthalpy of formation. *Toxicology in vitro*, 19:155-165.

Saumande J. 1991. La folliculogénèse chez les ruminants, *Recherche Vétérinaire*, v.167, p.205-218.

Sen CK, Khanna S, Roy S. 2006. Tocotrienols: vitamin E beyond tocopherols. *Life Sciences*, 78:2026-2032.

Shirota K, Tateishi K, Koji T, Hishikawa Y, Hachisuga T, Kuroki M, Kawarabayashi T. 2005. Early human preantral follicles have relaxin and relaxin receptor (LGR7), and relaxin promotes their development. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90:516-521.

Silva JRV, Van Den Hurk R, Costa SHF, Andrade ER, Nunes APA, Ferreira FVA, Lôbo RNB, Figueiredo JR. 2004. Survival and growth of goat primordial follicles after in vitro culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. *Animal Reproduction Science*, 81:273-286.

Souza MF, Rao VSN, Silveira ER. 1992. Antianaphylactic and antiinflammatory effects of ternatin, a flavonoid isolated from *Egletes viscosa* Less. *Brazilian Journal of Medical and Biology Research*, 25:1029-1032.

Souza MF, Rao VSN, Silveira ER. 1998. Prevention of acetaminophen-induced hepatotoxicity by ternatin, a bioflavonoid from *Egletes viscosa* Less. *Phytotherapy Research*, 12:557-561.

Souza MF, Tomé AR, Rao VS. 1999. Inhibition by the bioflavonoid ternatin of aflatoxin B1- induced lipid peroxidation in rat liver. *J Pharm Pharmacol*, 51:125-129.

Svanberg B. 1999. Apoptosis – the cellular mechanism of rat ovarian follicular atresia., Sweden, Göteborgs Universitet, Thesis.

Tao Y, Zhou B, Xia G, Wang F, Wu Z, Fu M. 2004. Exposure to L-ascorbic acid or α -tocopherol facilitates the development of porcine denuded oocytes from metaphase I to metaphase II and prevents cumulus cells from fragmentation. *Reproduction of Domestic Animal*, 39:52-57.

Tilly JL, Tilly KI. 1995. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormones to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. *Endocrinology*, 136:242-252.

Tsujii H, Muranaka M, Hamano K. 2002. Culture of *in vitro* mouse embryos with vitamin E improves development. *Journal of Reproduction and Development*, 48:25-29.

8. Table and figures legends

Table 1. Percentage of morphologically normal goat preantral follicles in control (non cultured) and after culture in presence or absence of α -tocopherol or ternatin.

Figure 1. Histological sections of ovarian tissue cultured for 5 days in 5 μ M of α -tocopherol (A and C) or ternatin (B and D) showing normal and degenerated follicles respectively (400X) o - oocyte, n - nucleus, gc - granulosa cells, arrow - oocyte membrane.

Figure 2. Percentage of developing follicles in control (non-cultured) or cultured for 1 and 5 days in presence or absence of α -tocopherol or ternatin.

Figure 3. Follicular diameter in control (non-cultured) or cultured for 1 and 5 days in presence or absence of α -tocopherol or ternatin.

Figure 4. Ultrastructural analysis of non cultured preantral follicle (control) (4200X) n - nucleus, m - mitochondria, er - endoplasmatic reticulum, g -Golgi complex, v - vesicles, o - oocyte, gc - granulosa cells, arrow -basal membrane.

Figure 5. Ultrastructural analysis of preantral follicle cultured for 5 days in MEM alone (A) and 5 μM of α -tocopherol (B) (4200X and 3000X) n – nucleus, nr – nuclear region, v – vesicles, o – oocyte, gc – granulosa cells, * – empty space.

Figure 6. Ultrastructural analysis of preantral follicle cultured for 5 days in 5 μM (A) e 10 μM (B) of ternatin (3750X and 5250X) n – nucleus, nr – nuclear region, v – vesicles, o – oocyte, gc – granulosa cells, * – empty space.

Table 1.

Control	75.3% (113/150)	
	D1 (%)	D5 (%)
MEM	50.7 (76/150)* ^{Aa}	40.0 (60/150)* ^{Aa}
TOC5	40.7 (61/150)* ^{Aab}	37.3 (56/150)* ^{Aab}
TOC10	32.0 (48/150)* ^{Bab}	29.3 (44/150)* ^{Aab}
TOC15	27.3 (41/150)* ^{Bab}	23.3 (35/150)* ^{Bab}
TER5	51.3 (77/150)* ^{Aab}	43.3 (65/150)* ^{Aab}
TER10	44.0 (66/150)* ^{Aac}	33.3 (50/150)* ^{Aab}
TER15	32.7 (49/150)* ^{Bab}	26.7 (40/150)* ^{Bab}

* differs significantly from control follicles (P<0.05)

A,B differs significantly from MEM alone in each day culture (P<0.05)

a differs significantly between culture period

b,c differs significantly between α -tocopherol and ternatin at same concentration and day culture (P<0.05)

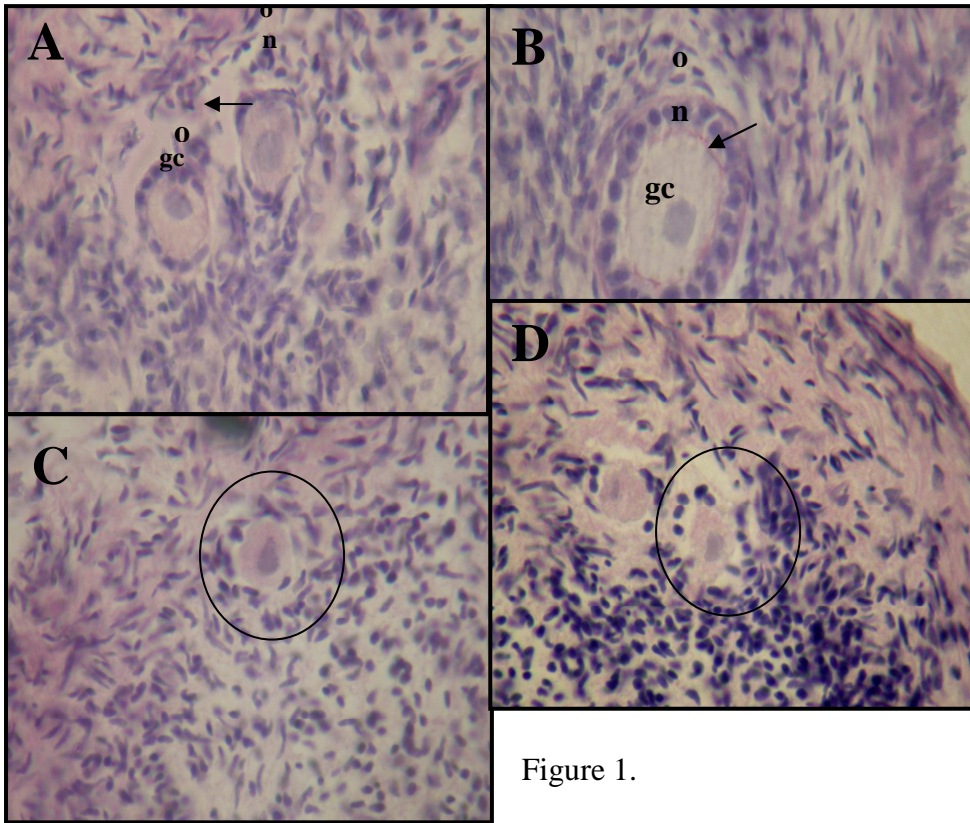
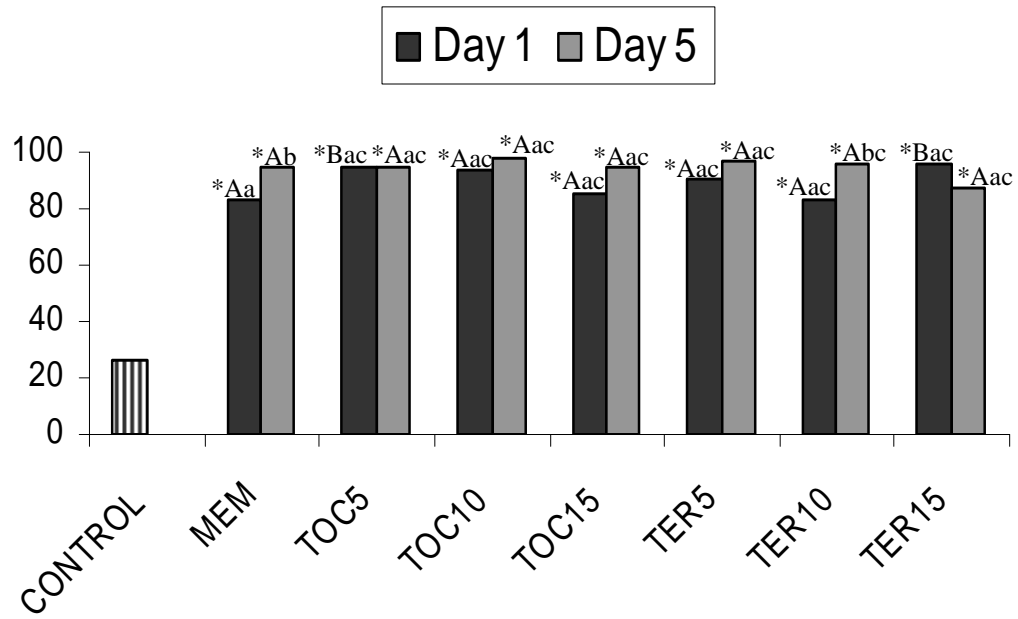
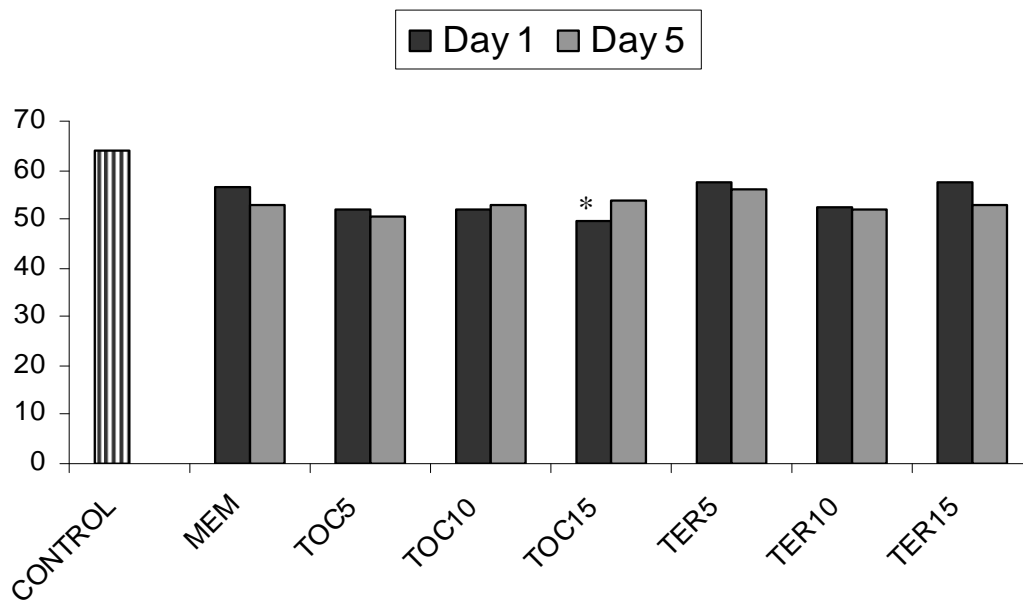


Figure 1.



* differs significantly from control ($P < 0.05$);
 A,B differs significantly from MEM ($P < 0.05$);
 a, b differs significantly between culture period (1 and 5 days) ($P < 0.05$);
 c differs significantly between α -tocopherol and ternatin at same concentration and day culture ($P < 0.05$);

Figure 2.



* differs significantly among treatments ($P < 0.05$)

Figure 3.

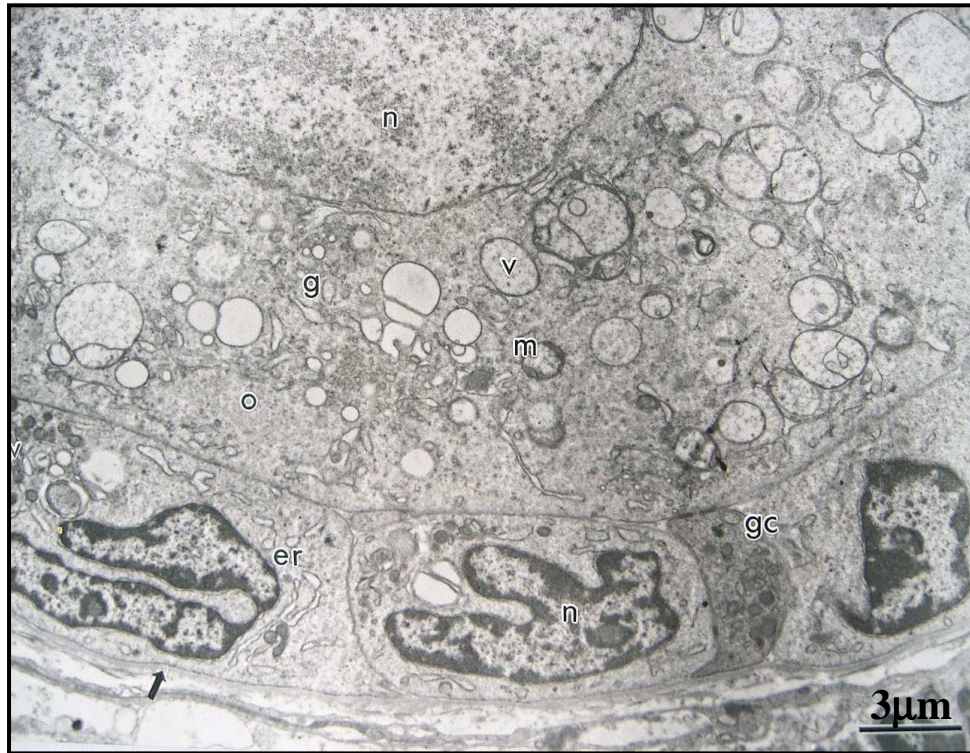


Figure 4.

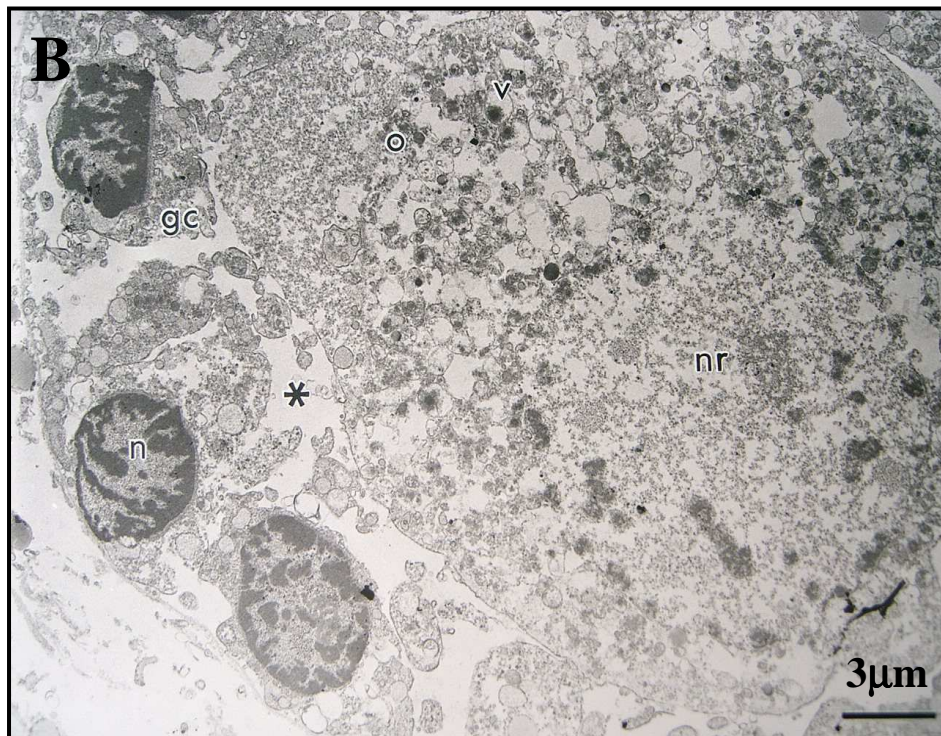
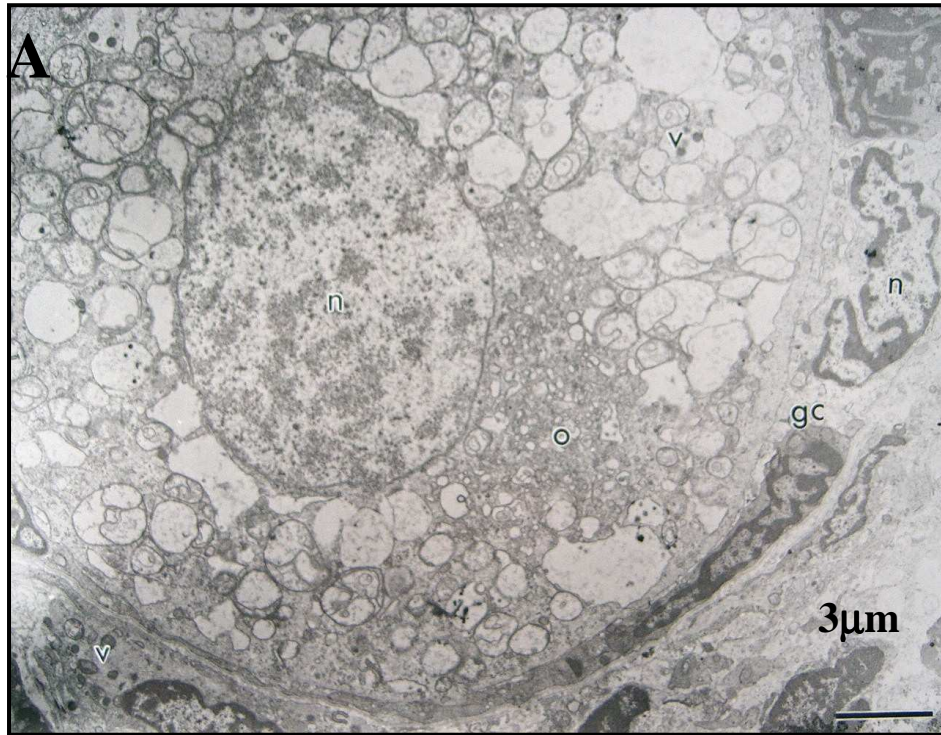


Figure 5.

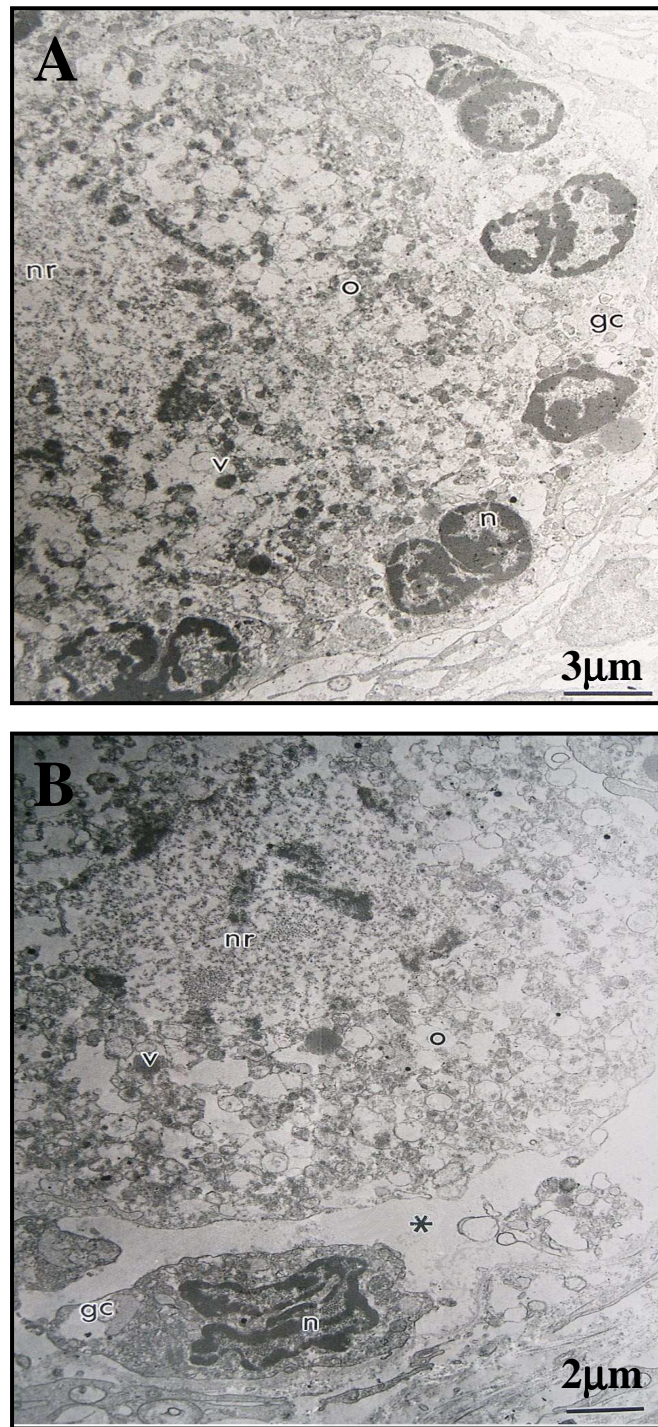


Figure 6.

Implicações do estresse oxidativo no ovário e embrião mamífero

(Implications of oxidative stress in the mammalian ovary and embryo)

I.B. Lima-Verde¹, J.B. Bruno², M.H.T. Matos², A.P.R. Rodrigues³,
J.R. Figueiredo³, M.A.L. Oliveira⁴, P.F. Lima^{4*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária – UFRPE - Recife-PE, Brasil

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – UECE - Fortaleza-CE, Brasil

³ Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais - UECE-Fortaleza-CE, Brasil

⁴ Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE – Recife-PE, Brasil

* Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171 900 Recife-PE (paulolima4045@hotmail.com)

Resumo

As espécies reativas de oxigênio (EROs) ou de nitrogênio (ERN) ou radicais livres são produtos do metabolismo orgânico normal e seu acúmulo pode gerar o estresse oxidativo. Este, por sua vez, causa injúrias celulares podendo levá-las à morte, estando este processo envolvido com a degeneração e/ou apoptose celular durante o desenvolvimento embrionário e em diferentes órgãos, como o ovário mamífero. No ovário de camundongas são produzidas EROs durante a regressão luteal, e estas estão envolvidas no processo de ativação folicular e retomada espontânea da meiose em oócitos. Embora sejam produzidos durante processos fisiológicos, o acúmulo de radicais livres no ovário mamífero pode desencadear patologias. No embrião, os radicais livres são produzidos normalmente devido ao metabolismo normal. Porém em ambientes *in vitro* com altas concentrações de oxigênio, o desenvolvimento do embrião pode ser prejudicado. O óxido nítrico é considerado um radical livre e participa de processos patológicos e fisiológicos como inflamação, ovulação, implantação embrionária e contração uterina. Para proteger os sistemas biológicos dos danos celulares causados pelos radicais livres, o organismo utiliza enzimas como catalase, superóxido-dismutase e glutatona peroxidase, e mecanismos que incluem substâncias antioxidantes tais como vitamina C, vitamina E, β -caroteno dentre outras.

Palavras-chave: radicais livres; antioxidantes; ovário; embrião

Abstract

Reactive oxygen (ROS) or nitrogen (RNS) species or free radicals are products of normal organic metabolism and their accumulation can generate the oxidative stress.

Then, this stress causes cellular damage, leading to death. This process is involved with cellular degeneration and/or apoptosis during embryos development and in different organs, such as the mammalian ovary. In murine ovary, ROS are produced during luteal regression and they are involved in the process of follicular activation and spontaneous meiosis resumption in oocytes. Although these are physiological processes, accumulation of free radicals in the mammalian ovary may unchain pathologies. In the embryo, free radicals are normally produced due to normal metabolism. However, in *in vitro* environment with high oxygen concentrations, embryo development can be damaged. Nitric oxide is considered a free radical and takes part in pathologic and physiologic processes, such as inflammation, ovulation, embryo implantation and uterine contraction. To protect the biological systems from cellular damage caused by free radicals, the organism uses enzymatic mechanism, which involves, for instance, catalase, superoxide-dismutase and glutathione peroxidase and others that include antioxidants substances, such as vitamin C, vitamin E, β -carotene, etc.

Keywords: free radicals; antioxidants; ovary; embryo

Introdução

A geração de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (EROs), como por exemplo o radical hidroxila (OH^\cdot), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ainda as espécies reativas de nitrogênio (ERN) como o óxido nítrico é um processo que ocorre naturalmente no organismo devido ao metabolismo celular normal (ORHAN et al., 2006). Portanto, esses radicais participam de reações fisiológicas normais no ovário e no embrião (WELLS et al., 2005), sendo também responsáveis pela indução de processos inflamatórios e respostas imunes (MIGNOTTE & VAYSSIERE, 1998). No entanto, sabe-se que o acúmulo desses componentes em condições onde os mecanismos antioxidantes de defesa estão deficientes pode levar ao estresse oxidativo. Este, por sua vez, é um fenômeno necessário ao crescimento, desenvolvimento e diferenciação celular (TUCKER & TOWNSEND, 2005) e está envolvido em diferentes tipos de injúrias

celulares, incluindo a peroxidação lipídica, oxidação de aminoácidos e ácidos nucleicos, apoptose e necrose (HALLIWELL, 1992).

Nos últimos anos tem-se estudado intensivamente o papel dos radicais livres e do estresse oxidativo na reprodução da fêmea mamífera, haja vista os prejuízos causados por estas moléculas no que se refere às patologias reprodutivas e quadros de infertilidade (AGARWAL et al., 2003). A presente revisão sumariza a origem dos radicais livres e suas principais implicações no ovário e embrião mamífero.

Origem das espécies reativas de oxigênio e do estresse oxidativo

O balanço intrínseco entre a vida e a morte celular pode ser influenciado por vários fatores ambientais. O acúmulo intracelular das EROs como o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^\cdot) pode resultar de um insulto tóxico ou do processo metabólico normal. As EROs podem alterar o sistema de defesa antioxidante natural das células, resultando em danos nas principais classes de macromoléculas biológicas, incluindo os ácidos nucleicos, as proteínas, os carboidratos e os lipídios (CHANDRA et al., 2000). Fisiologicamente várias moléculas reagem e degradam-se quando expostas ao oxigênio, dentre elas os ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares, enzimas, vitaminas e o DNA (HALLIWELL, 1997). Estas reações químicas também resultam na formação das EROs ou radicais livres e, na presença de íons e alguns metais no organismo, estes radicais tornam-se altamente reativos, gerando mais radicais livres, e o processo é então perpetuado (EARLE, 2001).

Partindo-se do princípio que as reações químicas geralmente não são quantitativas, pode-se estimar que cerca de 5% do oxigênio inalado seja convertido em EROs (CHANCE et al., 1979). Durante o processo de oxidação que normalmente ocorre nas células, o oxigênio é reduzido à água e os estágios intermediários desse processo correspondem às EROs (SETIADI et al., 2003). Os prejuízos causados no organismo

devido à ação dos radicais livres podem se acumular ao longo do tempo e implicar não somente em processos biológicos como o envelhecimento, como também em processos patológicos tais como inflamação, carcinogênese, Síndrome de Parkinson, catarata (CHANDRA et al., 2000), ooforite (BEHRMAN et al., 2001) e até mesmo resultar em desenvolvimento embrionário anormal (WELLS et al., 2005). As EROs são extremamente reativas e possuem vida curta. No entanto, o aumento na síntese dessas moléculas não causa necessariamente injúrias celulares se os mecanismos de defesa antioxidantes estiverem funcionando normalmente (ORHAN et al., 2006).

Os radicais livres podem induzir morte celular por necrose ou apoptose, dependendo das concentrações. Níveis baixos de EROs podem induzir apoptose, enquanto que o acúmulo de altos níveis dessas moléculas gera necrose ou pode levar as células comprometidas por apoptose a uma morte celular semelhante à necrose (MIGNOTTE & VAYSSIERE, 1998).

O estresse oxidativo é definido como uma elevação intracelular da concentração das EROs (BEDAIWY et al., 2004). As injúrias causadas pelo estresse oxidativo nas células *in vivo* e *in vitro* ocorrem através da exposição a agentes exógenos (radiação, produtos químicos) e devido ao metabolismo celular normal (OLSON & SEIDEL JR., 2000). Sob condições oxidativas extremas ou se os mecanismos de proteção antioxidantes estão comprometidos, podem ocorrer injúrias e morte celular por necrose ou apoptose, (NASR-ESFAHANI et al., 1990) devido à peroxidação lipídica e danos ao DNA (HIGUCHI, 2003).

Mecanismos protetores contra as EROs

O organismo possui dois tipos de mecanismos para eliminar ou minimizar a ação da geração excessiva das EROs. Um desses mecanismos compreende as reações

enzimáticas, enquanto o outro utiliza substâncias antioxidantes para regular o processo (SETIADI et al., 2003). No primeiro mecanismo, é necessária a presença de alguns elementos tais como magnésio, vanádio, cromo, manganês, ferro, cobre, zinco ou selênio no sítio ativo de algumas enzimas como por exemplo, superóxido dismutase (SOD), catalase (KITAGAWA et al., 2004) e glutaciona peroxidase (SETIADI et al., 2003) que removem as EROs das células. A enzima SOD participa da doação do O_2^- ao H_2O_2 , sendo este último convertido pela catalase a oxigênio e água (FRIDOVICH, 1995). A glutaciona e a glutaciona peroxidase desempenham o maior papel no controle celular da oxidação e são os mecanismos de defesa primários para remoção de peróxidos (HIGUCHI et al., 2003) e envolvem diretamente a ação de vários microelementos. O selênio encontra-se ligado a glutaciona peroxidase, agindo como um carreador temporário de oxigênio. O cobre e o zinco estão presentes na SOD juntamente com manganês, ferro e níquel. Estes dois últimos elementos também podem estar presentes na catalase. A responsabilidade da remoção do peróxido de hidrogênio dos sistemas biológicos é do ferro presente na catalase e do selênio contido na glutaciona peroxidase (SETIADI et al., 2003).

No segundo mecanismo, entram em ação as vitaminas C e E (BEHRMAN et al., 2001), licopeno, β -caroteno, flavonas, ácido lipóico dentre outras substâncias (AMIS & SHIGENAGA, 1992; CHASSE et al., 2001). Esses antioxidantes são encontrados em frutas e vegetais e suas necessidades no organismo são supridas pela ingestão através da dieta.

A vitamina E (α -tocoferol e derivados) é um antioxidante lipossolúvel presente nas células animais, protegendo-as das injúrias causadas pelos radicais livres (WANG et al., 2002; POVALISHEV et al., 2006). O α -tocoferol, por sua vez, reage com outros radicais livres de forma muito rápida (DUTTA & DUTTA, 2003), evitando assim a

propagação desses radicais pela sua própria conversão em um produto oxidado, o radical livre α -tocoferoxil (INGOLD et al., 1987). A forma original do α -tocoferol pode ser regenerada através de sua redução (doação de hidrogênio) pela vitamina C (SCHNEIDER, 2005), aumentando a capacidade antioxidante da vitamina E (TUCKER & TOWNSEND, 2005) e sugerindo o conceito de reciclagem dos antioxidantes. A regeneração do α -tocoferol implica na manutenção da concentração dessa substância na membrana celular (SEN et al., 2006).

A vitamina C (ácido ascórbico) é um importante antioxidante hidrossolúvel que limita a difusão do ânion superóxido na membrana celular e atua também na remoção do H_2O_2 , protegendo os lipídios e as proteínas da membrana celular das injúrias oxidativas (KRAMARENKO et al., 2006).

Espécies reativas de oxigênio no ovário

Vários estudos (AGARWAL et al., 2003; McCLUSKEY et al., 1999) sugerem que as EROs estejam envolvidas no processo de apoptose ou morte celular programada no ovário. Sabe-se que o O_2^- , o H_2O_2 e peróxidos lipídicos são gerados pelas células luteais durante a regressão do corpo lúteo, naturalmente ou induzida por prostaglandina, em camundongas (BEHRMAN et al., 2001), sendo esta resposta associada a uma depleção reversível do ácido ascórbico presente nessas células (ATEN et al., 1992; RILEY & BEHRMAN, 1991).

Em oócitos imaturos, os antioxidantes bloqueiam a retomada espontânea da meiose e a maturação oocitária induzida por gonadotrofinas, as quais podem ser revertidas pela geração de radicais livres (TAKAMI et al., 1999; TAKAMI et al., 2000). Tanto em folículos como no corpo lúteo, os leucócitos são a maior fonte de EROs (BEHRMAN et al., 2001). Também se sabe que a maioria dos folículos presentes no ovário (cerca de 99%) não chega a ovular, mas morre pelo processo de atresia, a qual

pode ocorrer por via degenerativa ou apoptótica (FIGUEIREDO et al., 1995), podendo esta última ser influenciada pelas EROs.

A geração de radicais livres pode desempenhar importante papel fisiológico no ovário, no entanto a produção cíclica destes agentes durante anos pode levar a um risco de patologias ovarianas, as quais podem provavelmente ser exacerbadas sob condições antioxidantes precárias. Como exemplo, podem ser citadas doenças como a ooforite e a falência ovariana prematura autoimune (BEHRMAN et al., 2001).

Espécies reativas de oxigênio no embrião

As EROs podem ser originadas do metabolismo embrionário normal (GOTO et al., 1993), podendo alterar vários tipos de moléculas celulares, além de induzir o bloqueio ou retardo no desenvolvimento (GUERIN et al., 2001) e comprometer a viabilidade embrionária (OLSON & SEIDEL JR., 2000). No entanto, o papel exato do estresse oxidativo no desenvolvimento embrionário ainda não está bem elucidado.

Estudos mostraram que durante a embriogênese pode ocorrer morte celular por apoptose (PARCHMENT, 1991; PIERCE et al., 1991). Sendo este um fenômeno que ocorre naturalmente em embriões *in vivo*, muitos autores sugeriram que a apoptose em embriões produzidos *in vitro* pode ser exacerbada devido às condições de cultivo (BYRNE et al., 1999; MATWEE et al., 2000; VAN SOOM et al., 2002). Uma função muito importante da apoptose no desenvolvimento embrionário é a eliminação de uma minoria de células anormais ou supérfluas e no controle do número de células embrionárias (FABIAN et al., 2005).

Os embriões mamíferos em estágios iniciais de desenvolvimento são susceptíveis às injúrias causadas pelas EROs e aumentam a produção de radicais livres quando cultivados *in vitro* (GOTO et al., 1993). Embriões de ratos (UMAOKA et al., 1992), ovinos (THOMPSON et al., 1990) e bovinos (KHURANA e NIEMANN, 2000)

cultivados *in vitro* e submetidos a baixas concentrações (5%) de oxigênio mostraram altas taxas de desenvolvimento quando comparados com embriões cultivados sob altas concentrações (20%) deste gás. Este fato é indicativo de que uma alta concentração de oxigênio reduz o desenvolvimento embrionário devido ao acúmulo de EROs (KITAGAWA et al., 2004), estando portanto o estresse oxidativo envolvido no desenvolvimento embrionário anormal (BEDAIWY et al., 2004).

Óxido Nítrico

Um outro componente resultante das reações metabólicas e também considerado um radical livre, é o óxido nítrico. Este composto é um gás, cuja molécula é pequena e hidrofóbica e pode passar facilmente através de membranas (KIECHLE e ZHANG, 2002). Trata-se de um mediador importante de processos fisiológicos e patológicos de injúrias celulares e provavelmente da apoptose. No entanto, os mecanismos pelos quais o óxido nítrico induz esse processo permanecem desconhecidos (KIECHLE e ZHANG, 2002). O óxido nítrico é produzido por três tipos de enzimas sintetases: óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS), óxido nítrico sintetase neuronal (nNOS) e óxido nítrico sintetase indutora (iNOS), que são expressas em vários tecidos (VIÑAS et al., 2005). O perfil fisiológico normal da produção de óxido nítrico é difícil de ser definido, porém se sabe que quando seus níveis estão aumentados, podem ocorrer efeitos tóxicos visto que o óxido nítrico é um radical livre. Também se sabe que esta molécula exerce um *feedback* negativo sobre si mesmo, inibindo as enzimas NOS (MITCHELL et al., 2004) e que possui um papel duplo como mediador ou supressor na morte celular (KIECHLE e ZHANG, 2002).

O óxido nítrico é um mensageiro bioquímico com diversas ações nos sistemas fisiológicos e está envolvido em vários processos reprodutivos nas fêmeas tais como ovulação, implantação e contração uterina (MAUL et al., 2003). O óxido nítrico pode

prevenir a apoptose em vários tipos celulares tais como células endoteliais (DIMMELER et al., 1997) e folículos ovarianos (CHUN et al., 1995). A inibição da apoptose pelo óxido nítrico pode envolver a regulação de sistemas antioxidantes intracelulares além da inibição de enzimas pró-apoptóticas como as caspases (KIECHLE e ZHANG, 2002).

No ovário, o óxido nítrico influencia positivamente a remodelação tecidual na ovulação (JABLONKA-SHARIFF e OLSON, 1997). Estudos mostraram a presença das enzimas NOS em folículos de camundongas em vários estágios de crescimento, onde o desenvolvimento folicular foi comprometido quando se usou inibidores para essas enzimas (MITCHELL et al., 2002). O papel das enzimas NOS também foi demonstrado na maturação oocitária em murinos, as quais agem poucas horas antes da ovulação (NAKAMURA et al., 2002). Sabe-se também que o óxido nítrico é um inibidor da esteroidogênese de células da granulosa cultivadas *in vitro* (DAVE et al., 1997). No embrião, o óxido nítrico pode alterar a sinalização embrionária e iniciar a hidroxilação e nitração das proteínas embrionárias e do DNA, afetando diretamente o desenvolvimento embrionário (MAUL et al., 2003).

Estudos mostraram que o óxido nítrico pode levar à morte celular devido à sua alta reatividade com o ânion superóxido. Esta reação aumenta a produção de peroxinitrito, um oxidante altamente tóxico, causando assim os danos celulares (HSIEH et al., 2006). Sob condições fisiológicas, o peroxinitrito reage rapidamente com o dióxido de carbono (CO_2) resultando na formação de dióxido de nitrogênio (NO_2^-) e ânion carbonato (CO_3^-) (UPPU et al., 1996). Esses radicais participam da nitração aromática da tirosina, a qual pode interferir em importantes mecanismos de sinalização celular (MONTEIRO, 2002) tais como proliferação e diferenciação celular (MONDORO et al., 1997).

Considerações Finais

A geração de radicais livres ou EROs (peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e radical hidroxila) e ERN (óxido nítrico e peroxinitritos) ocorre em processos metabólicos normais, tais como crescimento e diferenciação celular. Essas moléculas podem funcionar como sinalizadoras e indutoras de processos que causam injúrias às células, como a peroxidação dos lipídios das membranas, danos ao DNA e morte celular por apoptose ou necrose, ou simplesmente participar de processos fisiológicos como ovulação, regressão do corpo lúteo e crescimento embrionário. Os níveis intracelulares dessas substâncias é que vão determinar se a célula continua viva ou morre por apoptose ou necrose. Desta forma, observa-se que o papel das substâncias e enzimas antioxidantes no organismo é de fundamental importância para manutenção do equilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes nos sistemas biológicos.

Referências Bibliográficas

AGARWAL, A. et al. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**, v.79, p.829-843, 2003.

ATEN, R.F. et al. Regulation of ovarian antioxidant vitamins, reduced glutathione and lipid peroxidation by luteinizing hormone and prostaglandin F_{2α}. **Biology of Reproduction**, v.46, p.401-407, 1992.

BEHRMAN, H.R. et al. Oxidative stress and the ovary. **Journal of Society for Gynecology Investigation**, v. 8, p.40-42, 2001.

BYRNE, A.T. et al. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 117, p.97-105, 1999.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Reviews**, v.59, p.527, 1979.

CHANDRA, J. et al. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, p.323-333, 2000.

CHASSE, G.A. et al. An ab initio computational study on selected lycopene isomers. **Journal of Molecular Structure**, v.571, p.27-37, 2001.

CHUN, J.Y. et al. Interleukin-1 β suppresses apoptosis in rat ovarian follicles by increasing nitric oxide production. **Endocrinology**, v.136, p.3120-3127, 1995.

DAVE, S. et al. Evidence that nitric oxide inhibits steroidogenesis in cultured rat granulosa cells. **Clinical Science**, v.92, p.277-284, 1997.

DIMMELER, S. et al. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1 β -converting (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. **Journal of Experimental Medicine**, v.185, p.601-608, 1997.

DUTTA, A.; DUTTA S.K. Vitamin E and its role in the prevention of atherosclerosis and carcinogenesis: a review. **Journal of American College of Nutrition**, v.22, p.258-268, 2003.

EARLE, K.E. Nutrientes antioxidantes: seu papel em uma dieta saudável. **Temas de Veterinária**, v.3, p.3-9, 2001.

FABIAN, D. et al. Apoptotic process during mammalian preimplantation development. **Theriogenology**, v. 64, p. 221-231, 2005.

FIGUEIREDO, J.R. et al. Extracellular matrix proteins and basement membrane: their identification in bovine ovaries and significance for the attachment of cultured preantral follicles. **Theriogenology**, v. 43, p. 845-858, 1995.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutase. **Annual Review of Biochemistry**, v.64, p.97-112, 1995.

GOTO, Y. et al. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured *in vitro*. **Theriogenology** v.15, p.69-75, 1993.

GUERIN, P. et al. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**, v.7, p.175-189, 2001.

HALLIWELL, B. et al. Review article: free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.119, p.598-620, 1992.

HALLIWELL B. Antioxidants and human disease: a general introduction. **Nutrition Review**, p. 44-52, 1997.

HIGUCHI, Y. Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. **Biochemical Pharmacology**, v.66, p.1527-1535, 2003.

HSIEH, T.J. et al. Actinodaphnine induces apoptosis through increased nitric oxide, reactive oxygen species and down-regulation of NF- κ B signaling in human hepatoma Mahlavi cells. **Food and Chemical Toxicology**, v.44, p.344-354, 2006.

INGOLD, K.U. et al. Vitamin E remains the major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human plasma even in individuals suffering severe vitamin E deficiency. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.259, p.224-225, 1987.

JABLONKA-SHARIFF, A.; OLSON, L.M. Hormonal regulation of nitric oxide synthases and their cell-specific expression during follicular development in the rat ovary. **Endocrinology**, v.138, p.460-468, 1997.

KHURANA NK, NIEMANN H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. **Theriogenology** v. 54 p. 741-756, 2000.

KIECHLE, F.L.; ZHANG, X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. **Clinica Chimica Acta**, v.326, p.27-45, 2002.

KITAGAWA, Y. et al. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* development ability, production of reactive oxygen species (ROS) and DNA fragmentation in porcine embryos. **Theriogenology**, v.62, p.1186-1197, 2004

KRAMARENKO, G.G. et al. Ascorbate enhances the toxicity of photodynamic action of Verteporfin in HL-60 cells. **Free Radical Biology & Medicine**, 2006 (in press).

MATWEE, C. et al. Apoptosis in the early bovine embryo. **Zygote**, v.8, p.57-68, 2000.

MAUL, H. et al. Nitric oxide and its role during pregnancy: from ovulation to delivery. **Current Pharmaceutical Design**, v.9, p.359-380, 2003.

MIGNOTTE, B.; VAYSSIERE, J.L. Mitochondria and apoptosis. **European Journal of Biochemistry**, v.252, p.1-15, 1998.

MITCHELL, L.M. et al. Pharmacological manipulation of nitric oxide levels in mouse follicle cultures demonstrates key role of extrafollicular control of ovulation. **Human Reproduction**, v.19, n.8, p.1705-1712, 2004.

MONDORO, T.H. et al. Peroxynitrite-induced tyrosine nitration and phosphorylation in human platelets. **Free Radical Biology & Medicine**, v.22, n.6, p.1055-1063, 1997.

MONTEIRO HP. Signal transduction by protein tyrosine nitration: competition or cooperation with tyrosine phosphorylation-dependent signaling events? **Free Radical Biology & Medicine**, v.33, n.6, p.765-773, 2002.

NASR-ESFAHANI, M.H. et al. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed *in vitro* or *in vivo*. **Development**, v.109, p.501-507, 1990.

OLSON, S.E.; SEIDEL JR, G.E. Culture of *in vitro*-produced bovine embryos with vitamin E improves development *in vitro* and after transfer to recipients. **Biology of Reproduction**, v.62, p.248-252, 2000.

ORHAN, H. et al. Application of lipid peroxidation and protein oxidation biomarkers for oxidative damage in mammalian cells. A comparison with two fluorescent probes. **Toxicology in Vitro**, 2006 (in press)

PARCHMENT, R.E. Programmed cell death (apoptosis) in murine blastocysts: extracellular free radicals, polyamines and other cytotoxic agents. **In Vivo**, v.5, p.493-500, 1991.

PIERCE, G.B. Hydrogen peroxide as a mediator of programmed cell death in the blastocyst. **Differentiation**, v. 46, p.181-186, 1991.

POVALISHEV, V.N. et al. Effects of α -tocopherol and related compounds on reactions involving various organic radicals. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 2006 (in press).

RILEY, J.C.M.; BEHRMAN, H.R. *In vivo* generation of hydrogen peroxide in the rat corpus luteum during luteolysis. **Endocrinology**, v.128, p.1749-1753, 1991.

SCHNEIDER, C. Chemistry and biology of vitamin E. **Molecular Nutrients and Food Research**, v.49, p.7-30, 2005.

SEN, C.K. et al. Tocotrienols: vitamin E beyond tocopherols. **Life Sciences**, 2006 (in press).

SETIADI, D.H. et al. Vitamin E models. Can the anti-oxidant and pro-oxidant dichotomy of α -tocopherol be related to ionic ring closing and radical ring opening redox reactions? **Journal of Molecular Structure**, v.620, p.93-106, 2003.

TAKAMI, M. et al. Antioxidants reversibly inhibit the spontaneous resumption of meiosis. **American Journal of Physiology -Cell Physiology**, v.276, p.684-688, 1999.

TAKAMI, M. et al. Eicosatetraenoic and eicosatrienoic acids, lipoxygenase inhibitors, block meiosis via antioxidant action. **American Journal of Physiology -Cell Physiology**, v. 278, p.646-650, 2000.

THOMPSON, J.G. et al. Effect of oxygen concentration on *in vitro* development of preimplantation sheep and cattle embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.89, p.573-578, 1990.

TUCKER, J.M.; TOWNSEND, D.M. Alpha-tocopherol: roles in prevention and therapy of human disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.59, p.380-387, 2005.

UMAOKA, Y. et al. Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. **Molecular Reproduction Development** v.31, p.28-33, 1992.

UPPU, R.M. et al. Acceleration of peroxy-nitrite oxidations by carbon dioxide. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.327, n.2, p.335-343, 1996.

VAN SOOM, A. et al. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition. **Theriogenology**, v.57, p.1453-1465, 2002.

VIÑAS, J.L. et al. NO and NOS isoforms in the development of apoptosis in renal ischemia/reperfusion. **Free Radical Biology & Medicine**, v.40, p.992-1003, 2006.

WANG, X. et al. Vitamin-C and vitamin-E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. **Fertility & Sterility**, v.78, p. 1272-1277, 2002.

WELLS, P.G. Molecular and biochemical mechanisms in teratogenesis involving reactive oxygen species. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.207, p.352-366, 2005.