



RENORBIO – REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO - UFRPE

**INFLUÊNCIA DA RUTINA SOBRE A ATIVAÇÃO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS  
PRIMORDIAIS OVINOS E CONTRA A TOXICIDADE OVARIANA INDUZIDA  
PELA CISPLATINA E DOXORRUBICINA EM CAMUNDONGOS**

THAE LANNE BARBOSA GAMA LINS

Petrolina – 2021

THAE LANNE BARBOSA GAMA LINS

**INFLUÊNCIA DA RUTINA SOBRE A ATIVAÇÃO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS  
PRIMORDIAIS OVINOS E CONTRA A TOXICIDADE OVARIANA INDUZIDA  
PELA CISPLATINA E DOXORRUBICINA EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Biotecnologia da Universidade Federal Rural de  
Pernambuco, como requisito para defesa de tese.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Helena Tavares de Matos

Coorientador: Prof. Dr. Raimundo Campos Palheta Júnior

Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Daniela da Silva Pereira Campinho

Petrolina, 2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

L759

Lins, Thae Lanne Barbosa Gama

Influência da rotina sobre a ativação in vitro de folículos primordiais ovinos e contra a toxicidade ovariana induzida pela cisplatina e doxorubicina em camundongos / Thae Lanne Barbosa Gama Lins. - 2021.  
146 f. : il.

Orientadora: Maria Helena Tavares de Matos.

Coorientador: Raimundo Campos Palheta Junior.

Inclui referências e anexo(s).

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Doutorado em Biotecnologia – Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Recife, 2021.

1. Cultivo in vitro. 2. Estresse oxidativo. 3. Função ovariana. 4. Quimioterapia. 5. PI3K. I. Matos, Maria Helena Tavares de, orient. II. Junior, Raimundo Campos Palheta, coorient. III. Título

CDD 620.8

---

RENORBIO – REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**INFLUÊNCIA DA RUTINA SOBRE A ATIVAÇÃO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS  
PRIMORDIAIS OVINOS E CONTRA A TOXICIDADE OVARIANA INDUZIDA  
PELA CISPLATINA E DOXORRUBICINA EM CAMUNDONGOS**

Tese de doutorado elaborada por  
**THAE LANNE BARBOSA GAMA LINS**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Dr<sup>a</sup>. Alane Pains Oliveira do Monte**  
**Suporte Técnico aos laboratórios da UNIVASF**

---

**Prof. Dr. Anderson Weiny Barbalho Silva**  
**Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da UFC - Sobral**

---

**Prof. Dr. Helinando Pequeno de Oliveira**  
**Colegiado de Engenharia Elétrica da UNIVASF**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Xirley Pereira Nunes**  
**Colegiado de Ciências Farmacêuticas da UNIVASF**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela sua plenitude e magnitude diante dos homens e da sua ciência.

À minha mãe Lindinalva Barbosa da Silva, por ser esse ser maravilhoso, que teve paciência e me ensinou a gostar de estudar, ler, falar corretamente e que sempre esteve ao meu lado, ajudando-me e ensinando-me em todos os obstáculos e momentos felizes na minha vida.

Ao meu esposo Elenildo da Silva Gama, por ser esse parceiro que eu tenho certeza que posso contar em todos os momentos, incentivando, dando força, consolando, compartilhando momentos tristes e felizes.

Aos meus avós Ildete Gomes Lins e Félix Lopes Lins (in memoriam), pelo imenso amor, amparo e carinho.

Aos meus tios Ivanilde Vieira Lins e Manoel Gomes Lins, por serem meus segundos pais, pelo apoio e incentivo em tudo.

Ao meu pai Urbano Gomes Lins pela dedicação nos últimos anos.

Aos meus irmãos Taís Emanuela B. Lins, Talyne B. Roseno, Ruth Tatiana B. Roseno, Vinícius F. Lins e Urbano Filho F. Lins, pelo companheirismo, afeto, cumplicidade de toda uma vida.

Aos meus sobrinhos Guilherme L. Guimarães e Lana Q. L. Guimarães por toda a fofura e alegria que me concedem.

A toda a minha família (tios e primos), pela sua cumplicidade, preocupação, incentivo, comemorações. Pela sua existência dando uma razão para a minha vida.

Ao grupo de pesquisa Biotecnologia Aplicada ao Desenvolvimento de Folículos Ovarianos (BIOFOV) pelo imenso apoio na realização dos experimentos, parceria e amizade compartilhados.

À minha orientadora Maria Helena Tavares de Matos, pela paciência, dedicação, ajudando-me a crescer como pessoa e como profissional.

À Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, por me proporcionar a oportunidade de fazer este curso, e dar o apoio necessário para que futuramente possa obter o título de doutora e pela disponibilidade de excelentes profissionais, especialmente, pela secretária Sandra Morgado pela compreensão e instruções.

À Universidade Federal do Vale do São Francisco pela disponibilidade do local para execução dos experimentos, contribuindo para minha formação profissional e pela disponibilidade de excelentes profissionais, especialmente, pelos funcionários do biotério e o técnico Francisco Peixoto.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco – FACEPE, pelo fornecimento da bolsa de doutorado.

Ao Prof. Dr. Raimundo Campus Palheta Júnior e à Dr<sup>a</sup>. Daniela da Silva Pereira Campinho, pela coorientação e apoio na execução dos experimentos e elaboração da metodologia.

Aos componentes da banca, pelo conhecimento e contribuição na elaboração do presente trabalho.

## RESUMO

Os objetivos deste estudo foram analisar os efeitos da rutina no desenvolvimento folicular após cultivo *in vitro* de tecido ovariano ovino e contra a toxicidade ovariana induzida pela cisplatina ou doxorrubicina em camundongos, e verificar o possível envolvimento da via fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e seus membros como a proteína quinase B (AKT), fosfatase e homólogo de tensina (PTEN) e proteína Forkhead box O3 (FOXO3a) nas ações da rutina no ovário dessas espécies. Para o capítulo 1 desta tese, fragmentos de ovário ovino foram cultivados em meio essencial  $\alpha$ -mínimo ( $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>) ou neste meio suplementado com 0,1; 1 ou 10  $\mu$ g/mL de rutina por 7 dias. A inibição da atividade da PI3K foi realizada em fragmentos cultivados com LY294002. Foram avaliados: sobrevivência folicular, ativação e crescimento de folículos primordiais, apoptose, fosforilação de AKT (p-AKT). Os resultados mostraram que 1  $\mu$ g/mL de rutina apresentou maior porcentagem de folículos normais, ativação e crescimento ( $P < 0,05$ ) do que  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>. Após a inibição da PI3K, houve redução ( $P < 0,05$ ) da sobrevivência, ativação e crescimento folicular, bem como da imunolocalização da p-AKT. Para o experimento *in vivo* com cisplatina (capítulo 2), os camundongos foram divididos em grupos: controle, que recebeu solução salina por via oral (0,15 M); grupo controle positivo, que recebeu N-acetilcisteína (150 mg/kg, v.o.); o grupo cisplatina que recebeu cisplatina (5 mg/kg de peso corporal, i.p.); e os grupos de rutina que receberam rutina (10, 30 e 50 mg/kg, v.o.) uma vez ao dia por 3 dias. No capítulo 3, os camundongos receberam solução salina (controle, 0,15 M, i.p.) ou doxorrubicina (10 mg/kg de peso corporal, i.p.) ou foram pré e pós-tratados com rutina (10, 30 ou 50 mg/kg de peso corporal, v.o.) antes e depois da doxorrubicina (10 mg/kg de peso corporal, i.p.) uma vez ao dia por 5 dias. Ao final dos experimentos, os ovários foram coletados para avaliação da morfologia folicular, apoptose, proliferação celular, fosforilação de PTEN (p-PTEN) e FOXO3a (p-FOXO3a), níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), glutathiona (GSH) e mitocôndrias ativas. Os resultados mostraram que a rutina (10 ou 30 mg/kg nos capítulos 2 e 3, respectivamente) manteve os folículos normais e a proliferação celular, reduziu a apoptose e aumentou os níveis de GSH e a atividade mitocondrial em comparação aos tratamentos com cisplatina ou doxorrubicina ( $P < 0,05$ ). Além disso, a rutina (10 mg/kg) aumentou a expressão de p-FOXO3a e reduziu p-PTEN em relação à cisplatina (capítulo 2). Em conclusão, a rutina promove a ativação de folículos primordiais e reduz a apoptose de folículos pré-antrais após cultivo *in vitro* de tecido ovariano ovino. Além disso, em camundongos, a rutina pode atenuar os danos ovarianos causados pelo tratamento com cisplatina e doxorrubicina através da via PI3K e seus membros. Desta forma, sugere-se que a rutina pode atuar na sobrevivência e no desenvolvimento dos folículos primordiais ovinos e pode ser utilizada como agente terapêutico antes do tratamento antineoplásico, fomentando o seu potencial biotecnológico através do redirecionamento de fármacos com a intenção de prevenir os danos ovarianos.

Palavras-chave: Cultivo *in vitro*, Estresse oxidativo, Função ovariana, Quimioterapia, PI3K.

## ABSTRACT

The aims of this study were to analyze the effects of rutin on the follicular development after *in vitro* culture of ovine ovarian tissue and against the ovarian toxicity induced by cisplatin or doxorubicin in mice, and to verify the possible involvement of the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) signaling pathway, and its members such as Protein kinase B (AKT), phosphatase and tension homolog (PTEN) and forkhead box O3a (FOXO3a) in the rutin actions in the ovary of these species. For chapter 1 of this thesis, ovine ovarian fragments were cultured in  $\alpha$ -minimum essential medium alone ( $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>) or in this medium supplemented with 0.1; 1 or 10  $\mu$ g/mL rutin (chapter 1) for 7 days. Inhibition of PI3K activity was performed in fragments cultured with LY294002. The following endpoints were analysed: follicle survival, activation and growth of primordial follicles, apoptosis and AKT phosphorylation (p-AKT). The results showed that 1  $\mu$ g/mL rutin has higher percentage of normal follicles, activation and growth ( $P < 0.05$ ) compared to  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>. After PI3K inhibition, there was a reduction ( $P < 0.05$ ) of follicular survival, activation and growth, as well as of p-Akt immunolocalization. For the *in vivo* experiment with cisplatin (chapter 2), mice were divided in groups: control, which received orally saline solution (0,15 M); the positive control group received *N*-acetylcysteine (150 mg/kg body weight, p.o.); the cisplatin group received cisplatin (5 mg/kg body weight, i.p.); and rutin groups received rutin (10, 30 e 50 mg/kg, v.o.) once daily for 3 days. In chapter 3, mice received saline solution (control, 0.15 M, i.p.) or doxorubicin (10 mg/kg body weight, i.p.) or they were pre and posttreated with rutin (10, 30 or 50 mg/kg body weight, p.o.) before and after doxorubicin (10 mg/kg body weight, i.p.) once daily for 5 days. At the end of the experiments, the ovaries were collected for evaluation of follicular morphology, apoptosis, cell proliferation, PTEN and FOXO3a phosphorylation (p-PTEN; p-FOXO3a), and levels of reactive oxygen species (ROS), glutathione (GSH) and active mitochondria. The results showed that rutin (10 or 30 mg/kg in chapter 2 and 3, respectively) maintained the normal follicles and cell proliferation, reduced apoptosis and increased GSH levels and mitochondrial activity compared to cisplatin or doxorubicin treatments ( $P < 0.05$ ). Moreover, rutin (10 mg/kg) increased the expression of p-FOXO3a and reduced p-PTEN in relation to cisplatin (chapter 2). In conclusion, rutin promotes primordial follicle activation and reduces apoptosis of preantral follicles after *in vitro* culture of sheep ovarian tissue. In addition, in mouse, rutin can attenuate the ovarian damage caused by cisplatin and doxorubicin treatment through the PI3K pathway and its members. Thus, it is suggested that rutin can act on the survival and development of ovine primordial follicles and can be used as a therapeutic agent before antineoplastic treatment, promoting its biotechnological potential through the redirection of drugs with the intention of preventing ovarian damage.

Keywords: *In vitro* culture, Oxidative stress, Ovarian function, Chemotherapy, PI3K.



## LISTA DE FIGURAS

### Revisão de literatura

- Figura 1.** Desenho esquemático do ovário mamífero. (Adaptado de GONÇALVES, 2012).....24
- Figura 2.** Foliculogênese: composição, estádios e maturação folicular (Adaptado de El-Hayek; Clark, 2016).....25
- Figura 3.** Maturação nuclear do oócito. (Adaptado de El-Hayek; Clark, 2016).....28
- Figura 4.** Comunicação bidirecional no microambiente do folículo ovariano. PTZ: projeções transzonais; VE: vesículas extracelulares; PTN: proteína; RNAmi: microRNA. (Adaptado de Andrade, 2019).....30
- Figura 5.** Causas e características morfológicas nos diferentes tipos de atresia. ATP: adenosina trifosfato; DNA: ácido desoxirribonucleico; TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa. (Arquivo pessoal).....33
- Figura 6.** Transdução de sinal de apoptose nas vias extrínseca e intrínseca. Setas pretas indicam conversão direta, enquanto setas azuis indicam ações catalíticas. Apaf-1: fator de ativação 1 da protease apoptótica; Bak e Bax: proteínas pró-apoptóticas efetoras semelhante ao BCL-2 sem o domínio BH4; BH3: membros pró-apoptóticos da família Bcl-2; Bcl-2: proteína do linfoma de células B-2; BclxL: proteína do linfoma extra grande de células B; Bim, Bid, Puma, Noxa, Hrk, Bmf e Bad: proteínas pró-apoptóticas BH3-apeenas; DR4/5: receptor de morte específico do TRAIL; FADD: proteína associada ao FAS com domínio da morte; FAS: receptor de morte específico do FASL; FASL: ligante de morte FASL; TNF: fator de necrose tumoral; TNF-R1: receptor do TNF; TRAIL: ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF. (Adaptado de NAGATA, 2018).....35
- Figura 7.** Representação esquemática demonstrando as consequências entre o equilíbrio e o desequilíbrio entre ERO e importantes vias antioxidantes enzimáticas celulares. ERO:

espécies reativas de oxigênio; GSH: glutathiona reduzida; GSSG: glutathiona oxidada; GPX: glutathiona peroxidase; GR: glutathiona redutase; H<sub>2</sub>O: água; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio; NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; O<sub>2</sub>: superóxido; OH<sup>-</sup>: hidroxil; SOD: superóxido dismutase. (Adaptado de LU *et al.*, 2018).....38

**Figura 8.** Representação esquemática da regulação antioxidante no desenvolvimento folicular. CCO: complexo cumulus-oócito; ERO: espécies reativas de oxigênio; GSH: glutathiona; FSH: hormônio folículo estimulante; LH: hormônio luteinizante; P450<sub>scc</sub>: citocromo P450; SOD: superóxido dismutase. (Adaptado de WANG *et al.*, 2017a).....40

**Figura 9.** Estrutura e funções da mitocôndria. ATP: adenosina trifosfato; ATC: ácido tri carboxílico; mtDNA: DNA mitocondrial; E3: proteína ligase de ubiquitina; AAA: proteases de AAA (ATPases). (Adaptado de PFANNER *et al.*, 2019).....43

**Figura 10.** Causas e consequências da disfunção mitocondrial no ovário. FOP: falha ovariana prematura; ERO: espécies reativas de oxigênio; mtDNA: DNA mitocondrial. (Arquivo pessoal).....45

**Figura 11.** Mecanismos propostos de dano ovariano induzido por quimioterapia e depleção folicular. (Adaptado de HAO *et al.*, 2019).....47

**Figura 12.** Principais mecanismos moleculares da citotoxicidade induzida pela cisplatina. CTR1: proteína transportadora de cobre; DNAm: DNA mitocondrial; DNA-Pt: DNA-platina (cisplatina); ERO: espécies reativas de oxigênio; OCT2: proteínas transportadoras de cátions orgânicos 2. (Adaptado de QUINTANILHA *et al.*, 2019).....51

**Figura 13.** Principais mecanismos moleculares da citotoxicidade induzida pela doxorrubicina. ATP: adenosina trifosfato; DNA: ácido desoxirribonucleico; DOX: doxorrubicina; ERO: espécies reativas de oxigênio; RNAm: RNA mensageiro. (Modificado de VARELA-LÓPEZ *et al.*, 2019).....53

**Figura 14.** Sinalização da via PI3K intra-oocitária no controle da ativação, sobrevivência e atresia de folículos primordiais. (Modificado de ZHENG *et al.*, 2012).....56

**Figura 15.** Ativação da via PI3K e da FOXO3a e suas respectivas funções e inibições. p-AKT: proteína quinase B fosforilada; PDK1: ; p- FOXO3a: fator de transcrição Forkhead BOX O3a fosforilado; PIP2: fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato; PIP3: fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato; PI3K: fosfatidilinositol-3-quinase; p-PTEN: fosfatase e homólogo de tensina fosforilada. Fonte: Arquivo pessoal.....57

**Figura 16.** Atresia folicular iniciada nas células da granulosa, em folículos em crescimento, regulada pela via PI3K/AKT/FOXO3a, caspases-3, 8, 9 e bcl-2. Folículo atrésico (A) e folículo saudável (B). AKT: proteína quinase B; BAX: proteína pró-apoptótica semelhante ao BCL-2 sem o domínio BH4; BIM: proteína 11 semelhante ao BCL-2; Bcl-2: proteína do linfoma de células B-2; CASP: caspase; Cit c: citocromo c; DR4: receptor de morte específico do TRAIL; FADD: proteína associada ao FAS com domínio da morte; FAS: receptor de morte específico do FASL; FASLG: ligante de morte FASL; FOXO3a: fator de transcrição Forkhead BOX O3a; FSH: hormônio folículo estimulante; FSHR: receptor do FSH; IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina-1; IGF1-R: receptor do IGF-1; PI3K: fosfatidilinositol-3-quinase; P53: proteína pró-apoptótica. (Modificado de MATSUDA *et al.*, 2012).....58

**Figura 17.** Ilustração da estrutura química da rutina original (quercetina-3-O-rutinosídeo) e seus metabólitos: aglicona, sulfato e glucuronídeo de quercetina e aglicona de isoramnetina (Adaptado de SITI *et al.*, 2020).....61

**Figura 18.** Ilustração da biotransformação da rutina em outras estruturas químicas: kaempferol-3-rutinosídeo, kaempferol-3-glicosídeo e kaempferol (Adaptado de LIN *et al.*, 2014).....62

**Figura 19.** Mecanismo molecular pelo qual a rutina estimula a biogênese mitocondrial. NRF: fator respiratório nuclear; PGC1 $\alpha$ : proteína coativadora-1 $\alpha$  do receptor  $\gamma$  ativada por

proliferador de peroxissoma; SIRT1: sirtuína 1; TFAM: fator de transcrição mitocondrial A. (Modificado de YUAN et al., 2017).....65

## Capítulo I

**Figure 1.** Percentages of morphologically normal follicles in the fresh control and after *in vitro* culture in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> or in the presence of different concentrations of rutin (A). (\*) Differs significantly from fresh control (P<0.05). (A, B) Different letters denote significant differences among treatments (P<0.05). Histological sections in ovine ovarian fragments containing normal follicles in fresh control (B) and after *in vitro* culture in medium containing 1  $\mu$ g/mL rutin (C), and atretic follicles in medium containing 10  $\mu$ g/mL rutin (D). Arrow indicates signs of degeneration; O: oocyte; GC: granulosa cells. Scale bars: 50  $\mu$ m (400x).....79

**Figure 2.** Percentage of apoptotic follicles in the fresh control and after *in vitro* culture in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> or in the presence of different concentrations of rutin (A). (\*) Differs significantly from fresh control (P<0.05). (A, B) Different letters denote significant differences among treatments (P<0.05). Immunohistochemical localization of activated caspase-3 (brown staining): follicles after *in vitro* culture in medium containing 1 and 10  $\mu$ g/mL rutin (B and C, respectively) and negative control (D). O: oocyte; GC: granulosa cells. Scale bars: 50  $\mu$ m (400x).....80

**Figure 3.** Percentages of normal primordial (A) and growing (B) follicles in the fresh control and after *in vitro* culture in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> or in different concentrations of rutin. (\*) Differs significantly from fresh control (P < 0.05). (A, B) Different letters denote significant differences among treatments (P<0.05).....81

**Figure 4.** Percentages of morphologically normal follicles in the fresh control and after *in vitro* culture in 1  $\mu$ g/mL rutin in the absence or in the presence of the inhibitor LY294002 (A). (\*) Differs significantly from fresh control (P<0.05). (A, B) Different letters denote significant differences among treatments (P<0.05). Histological sections in ovine ovarian fragments containing normal follicles in the fresh control (B) and after culture in medium containing 1  $\mu$ g/mL rutin in the absence (C) or presence (D) of LY294002. Arrow indicates signs of degeneration; O: oocyte; GC: granulosa cells. Scale bars: 50  $\mu$ m (400x).....82

**Figure 5.** Percentage of apoptotic follicles in the fresh control and after *in vitro* culture in 1 µg/mL rutin in the absence or in the presence of the inhibitor LY294002 (A). (\*) Differs significantly from fresh control (P<0.05). (A, B) Different letters denote significant differences among treatments (P<0.05). Immunohistochemical localization of activated caspase-3 (brown staining): follicles in the fresh control (B), after culture in 1 µg/mL rutin in the absence (C) or in the presence (D) of LY294002. O: oocyte; GC: granulosa cells. Scale bars: 50 µm (400x).....83

**Figure 6.** Percentages of normal primordial (A) and growing (B) follicles in the fresh control and after *in vitro* culture in 1 µg/mL rutin in the absence or in the presence of LY294002. (\*) Differs significantly from fresh control (P < 0.05). (A, B) Different letters denote significant differences among treatments (P<0.05).....84

**Figure 7.** Immunostaining and immunoexpression of p-Akt in ovine preantral follicles in the fresh control (A), after *in vitro* culture with 1 µg/mL rutin in the absence (B) or in the presence (C) of the inhibitor LY294002, and negative control (D). O: oocyte; GC: granulosa cells. Scale bars: 50 µm (400x).....85

### Capítulo III

**Figure 1.** Histological sections of mouse ovarian fragments in the control group (A); note the normal centrally located oocytes surrounded by well-organized granulosa cells, and well-preserved ovarian stroma (B, zoom of A); exposed to doxorubicin alone (C); note the vacuolated oocyte surrounded by disorganized granulosa cells (D, zoom of C); or exposed to 30 mg/Kg rutin plus doxorubicin (E); note the normal oocyte surrounded by normal granulosa cells (F, zoom of E). O: oocyte; GC: granulosa cells; Scale bars: 50 µm (A, C, E: 100x; B, D, F: 400x).....103

**Figure 2.** Total follicular survival (percentage of morphologically normal follicles; A), and percentage of morphologically normal follicles in different stages (primordial, primary, secondary, and antral follicles; B), in the control group, mice treated with doxorubicin (DOX) alone, treated with rutin (10, 30 or 50 mg/Kg) before doxorubicin. (A, B, C) Bars with different letters are significantly different (P < 0.05).....104

**Figure 3.** Percentage of PCNA-positive cells (A) and percentage of apoptotic follicles (B) in the control group, mice treated with doxorubicin (DOX) alone or treated with rutin (10, 30 or 50 mg/Kg) before doxorubicin treatment .....105

**Figure 4.** Immunohistochemical localization of PCNA-positive cells (A-H) and activated caspase-3 (I-P): follicles in the control group (A and B; I and J), treated with doxorubicin alone (C and D; K and L) or treated with 30 mg/Kg rutin plus doxorubicin (E and F; M and N), and negative control (G and H; O and P). O: oocyte; GC: granulosa cells; Scale bars: 50  $\mu$ m (A, C, E, G, I, K, M, O: 100x; B, D, F, H, J, L, N, P: 400x).....106

**Figure 5.** Intracellular levels of GSH and active mitochondria (A) in follicles of different groups exposed or not to doxorubicin (DOX) alone or in association with rutin (10, 30 or 50 mg/Kg). (<sup>A, B, C, D, E</sup>) Within each group (GSH or active mitochondria), bars with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). Detection of intracellular levels of GSH and mitochondrial function (B-K): follicles in the control (B, G), treated with doxorubicin alone (C, H), treated with 10 mg/Kg (D, I), 30 mg/Kg (E, J) or 50 mg/Kg (F, K) rutin plus doxorubicin. Scale bars: 50  $\mu$ m (100x).....107

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

**Table 1.** Mean oocyte and follicular diameters (mean  $\pm$  SEM) in the fresh control and after *in vitro* culture of ovine preantral follicle in different concentrations of rutin. (\*) Differs significantly from fresh control (P<0.05). (A, B, C) Different letters denote significant differences among treatments (within the column; P<0.05).....81

**Table 2.** Mean oocyte and follicular diameters (mean  $\pm$  SEM) in the fresh control and after *in vitro* culture of ovine preantral follicle in 1  $\mu$ g/mL rutin alone or with PI3K inhibitor. (\*) Differs significantly from fresh control (P<0.05). (A, B, C) Different letters denote significant differences among treatments (within the column; P<0.05).....84

## LISTA DE ABREVIACOES

$\alpha$ -MEM - meio essencial mínimo alfa modificado (alfa-Minimal Essential Medium)

AC - adenilato ciclase

AKT - proteína quinase B (Protein kinase B)

AMH - hormônio antimleriano (Anti-müllerian hormone)

AMPc - AMP cíclico

AMPK - proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (Adenosine monophosphate-activated protein kinase)

APAF-1 - fator de ativação 1 da protease apoptótica (Apoptotic protease activating factor-1)

ATG5 - gene 5 relacionado  autofagia (autophagy-related protein 5)

BAX - proteína semelhante ao BCL-2 sem o domínio BH4 (BAX protein)

BCL-2 - proteína do linfoma de células B-2 (B-cell lymphoma 2)

BCL2L11 ou BIM - proteína 11 semelhante ao BCL-2 (Bcl2-like protein 11)

BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro (Brain-derived neurotrophic factor)

BMP - proteína morfogenética óssea (Bone Morphogenetic Protein)

CASP - caspase

CAT - catalase

CGP - células germinativas primordiais

Cit c - citocromo c

CoQ - coenzima Q

COX-2 - ciclooxigenase-2

CTR1 - proteína transportadora de cobre (Copper transporter 1)



DcR1 ou TRAILR3 - receptor chamariz 1 ou receptor TRAIL 3

DR4/5 - receptor de morte específico do TRAIL

E<sub>2</sub> - estradiol

EGFR - receptor do fator de crescimento epidermal (Epidermal growth factor receptor)

ERN - espécie reativa de nitrogênio

ERO - espécies reativas de oxigênio

FADD - proteína associada ao FAS com domínio da morte (Fas-associated death domain protein)

FAS - receptor de morte específico do FASL (Fas death receptor)

FASL - ligante de morte FASL (Fas ligand)

FGF - fator de crescimento fibroblástico (Fibroblast growth factor)

Fig1 $\alpha$  - fator na linha germinativa  $\alpha$  (Factor in the germline alpha)

FNT - fator de necrose tumoral

FOXL2 - fator de transcrição Forkhead box L2 (Forkhead box L2)

FOXO3 - fator de transcrição Forkhead BOX O3 (Forkhead box O3)

FSH - hormônio folículo estimulante (Follicle stimulating hormone)

GDF-9 - fator de crescimento e diferenciação-9 (Growth differentiation factor 9)

GH - hormônio do crescimento (Growth hormone)

GMB - células de glioblastoma multiforme (Glioblastoma multiforme)

GMPc - GMP cíclico

GPX - glutational peroxidase

GR - glutational redutase

GSH - glutational reduzida

GSSG - glutationa oxidada

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio

IGF-1 - fator de crescimento semelhante à insulina-1 (Insulin-like growth factor 1)

KL - *Kit* ligand

LC3 - proteína associada aos microtúbulos 3 (Microtubule-Associated Protein 1-Light Chain 3)

LH - hormônio luteinizante (Luteinizing Hormone)

LIF - fator inibidor de leucemia (Leukemia Inhibitory Factor)

MAPK3 - proteína quinase 3 ativada por mitógeno (mitogen-activated protein kinase 3)

MLKL - proteína do tipo domínio da quinase de linhagem mista (Mixed lineage kinase domain-like)

mTOR - alvo mamífero da rapamicina (Mammalian target of rapamycin)

NAD<sup>+</sup> - dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (Nicotinamide adenine nucleotide)

NADPH - fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida H<sup>+</sup>  
(Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate H<sup>+</sup>)

NF-κB - fator nuclear kappa (Nuclear factor kappa B)

NO - óxido nítrico; monóxido de nitrogênio (Nitric oxide)

NOS - óxido nítrico sintase (Nitric oxide synthase)

NRF - fator respiratório nuclear (Nuclear respiratory factor)

NT - neurotrofinas

NTF5 - neurotrofina tipo 5

O<sub>2</sub>-• - ânion superóxido

OCT2 - proteínas transportadoras de cátions orgânicos (Organic cation transport 2)

•OH - hidroxil

P<sub>4</sub> - progesterona

P450SCC ou CYP11A1 - citocromo P450 (Cytochrome P450<sub>scc</sub>)

P62 ou SQSTM1 - proteína de ligação à ubiquitina ou sequestossomo-1 (Ubiquitin-binding protein or sequestome-1)

PCA – Ácido Protocatecuico (protocatechuic acid)

PCNA - antígeno nuclear de proliferação celular (Proliferating cell nuclear antigen)

PK1 - quinase-1 dependente de PI3K (PI3K-dependent kinase-1)

PI3K - fosfatidilinositol-3-quinase (Phosphatidylinositol-3-kinase)

PIP2 - fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (Phosphatidylinositol-(4,5) bound to the bisphosphate membrane)

PIP3 - fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (Phosphatidylinositol- (3,4,5) -triphosphate)

PK - proteína quinase (Protein kinase)

PKA - proteína quinase A (Protein kinase A)

PTEN - fosfatase e homólogo de tensina (Phosphatase and tensin homologous protein)

PTPmt - poros de transição da permeabilidade mitocondrial

RAS - proteínas RAS

RIPK - receptor de proteína quinase (Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase)

SIRT1- sirtuína 1 ou regulador de informação silenciosa 1

SOD - superóxido dismutase

STAR - proteína reguladora aguda de esteroides (Steroid acute regulatory protein)

TFAM - fator de transcrição mitocondrial A (Transcription factor A)

TGF- $\beta$  - fator de crescimento e transformação- $\beta$  (Transforming growth factor  $\beta$ )

TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral- $\alpha$  (Tumor necrosis factor- $\alpha$ )

TNF-R1 - receptor de morte específico do TNF

TRAIL - ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TNF-Apoptosis-inducing ligand)

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	21
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1. Oogênese e foliculogênese .....	23
2.1.1. Comunicação entre oócito e células da granulosa durante a foliculogênese .....	29
2.2. População e atresia folicular .....	31
2.3. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio .....	35
2.4. Antioxidantes .....	37
2.4.1. Defesa antioxidante no ovário .....	38
2.4.2. Antioxidantes naturais .....	40
2.4.3. Estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> testando o efeito de antioxidantes naturais em folículos ovarianos .....	41
2.5. Mitocôndrias e metabolismo energético celular.....	42
2.6. Câncer e fertilidade.....	45
2.7. Uso de biotecnologia reprodutiva para promover o desenvolvimento folicular <i>in vitro</i> ou para preservação da fertilidade contra agentes citotóxicos no ovário .....	47
2.8. Cisplatina .....	49
2.9. Doxorrubicina.....	51
2.10. Gonadotoxicidade causada pela cisplatina e doxorrubicina.....	54
2.11. Relação entre a via fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e os folículos ovarianos ...	55
2.11. Rutina .....	60
3. JUSTIFICATIVA .....	66
4. HIPÓTESES .....	68
5. OBJETIVOS .....	69
5.1. Objetivo geral.....	69
5.2. Objetivos específicos .....	69
Capítulo I.....	71
Capítulo II.....	94
Capítulo III. ....	95
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	114
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	115
8. ANEXO .....	144

## 1. INTRODUÇÃO

O cultivo *in vitro* de tecido ovariano utilizando modelos animais, como ovelhas, representa uma excelente ferramenta para aprimorar nossa compreensão do controle da foliculogênese na fase pré-antral, investigando os efeitos de diferentes hormônios, fatores de crescimento e produtos naturais na sobrevivência e ativação dos folículos primordiais e seus potenciais mecanismos de ação (ALAM; MIYANO, 2020; FIGUEIREDO et al., 2019; GUERREIRO et al., 2016; HEILIGENTAG; EICHENLAUB-RITTER, 2018). Além disso, o cultivo folicular pode ser utilizado para avaliar os efeitos de diferentes agentes citotóxicos na função ovariana (SONIGO et al., 2019), como os antineoplásicos utilizados na quimioterapia (GUERREIRO et al., 2020). Para avaliar essa gonadotoxicidade causada pela quimioterapia *in vivo*, pode-se utilizar modelos experimentais utilizando animais de laboratório, como os camundongos.

A quimioterapia e a radioterapia podem melhorar a qualidade de vida das mulheres, aumentando o tempo de sobrevivência. Entretanto, a falência ovariana prematura e a infertilidade feminina são efeitos secundários frequentes de terapias anticancerígenas, devido à extrema sensibilidade dos oócitos da reserva ovariana à toxicidade de antineoplásicos, como os compostos de platina, representados pela cisplatina, e compostos de antraciclina, representados pela doxorrubicina (NAFEES et al., 2015; BILDIK et al., 2018; DING et al., 2019; WANG et al., 2019).

A utilização clínica da cisplatina e doxorrubicina é limitada devido às suas toxicidades associadas ao estresse oxidativo ocasionado pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), peroxidação lipídica, dano ao DNA e apoptose (NAFEES et al., 2015; BILDIK et al., 2018; NGUYEN et al., 2019; DING et al., 2019). Além disso, alguns autores sugeriram que a perda folicular induzida por esses antineoplásicos é mediada por componentes da via de sinalização da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), como a proteína quinase B (AKT), o homólogo de fosfatase e tensina (PTEN) e a proteína Forkhead box O3 (FOXO3a) (CHANG et al., 2015; JANG et al., 2016; WANG et al., 2019). Desta forma, o uso de um agente antioxidante com possível atuação na via PI3K, poderia ser eficaz na prevenção da toxicidade causada pela cisplatina e pela doxorrubicina. Dentre os antioxidantes comumente utilizados como citoprotetores, destaca-se a rutina.

A rutina (3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona-3-ramnoglicosídeo) é um flavonoide muito encontrado em plantas, chás e frutas (GANESHPURKAR; SALUJA, 2017), possuindo diversas atividades biológicas, como anti-inflamatória, antitumoral, antibacteriana, neuroprotetora, antidiabética, anti-hipertensiva e anti-trombótica (CASSIDY et al., 2011; RAJU; GOUD; REDDY, 2019; MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000; HASANEIN et al., 2018; SALEH et al., 2019). A rutina é eficiente na supressão do estresse oxidativo *in vitro* induzido pelo colesterol em células ovarianas de hamster chinesas (AHERNE; O'BRIEN, 1999). Nossa equipe demonstrou que a adição de rutina ao meio de cultivo *in vitro* de folículos secundários ovinos, manteve a sobrevivência e aumentou os níveis de glutatona após 12 dias (LINS et al., 2017). Além disso, o tratamento com rutina pode aliviar a cardiotoxicidade da pirarrubicina por meio da ativação da via de sinalização PI3K/AKT em camundongos (FEI et al., 2019). Entretanto, os efeitos da rutina sobre o desenvolvimento folicular após cultivo *in vitro* de tecido ovariano e sobre a toxicidade ovariana induzida por cisplatina e doxorubicina *in vivo*, ainda são desconhecidos.

Dessa forma, tendo em vista que os flavonoides podem influenciar as funções celulares, a compreensão acerca da ação da rutina na fisiologia reprodutiva poderá abrir uma perspectiva de utilização deste composto como suplemento de meio de cultivo de folículos ovarianos e/ou em formulações medicamentosas para serem usadas como um pré-tratamento em mulheres que são submetidas à quimioterapia. Para uma melhor compreensão da relevância do presente trabalho, a seguir, será apresentada uma revisão de literatura.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

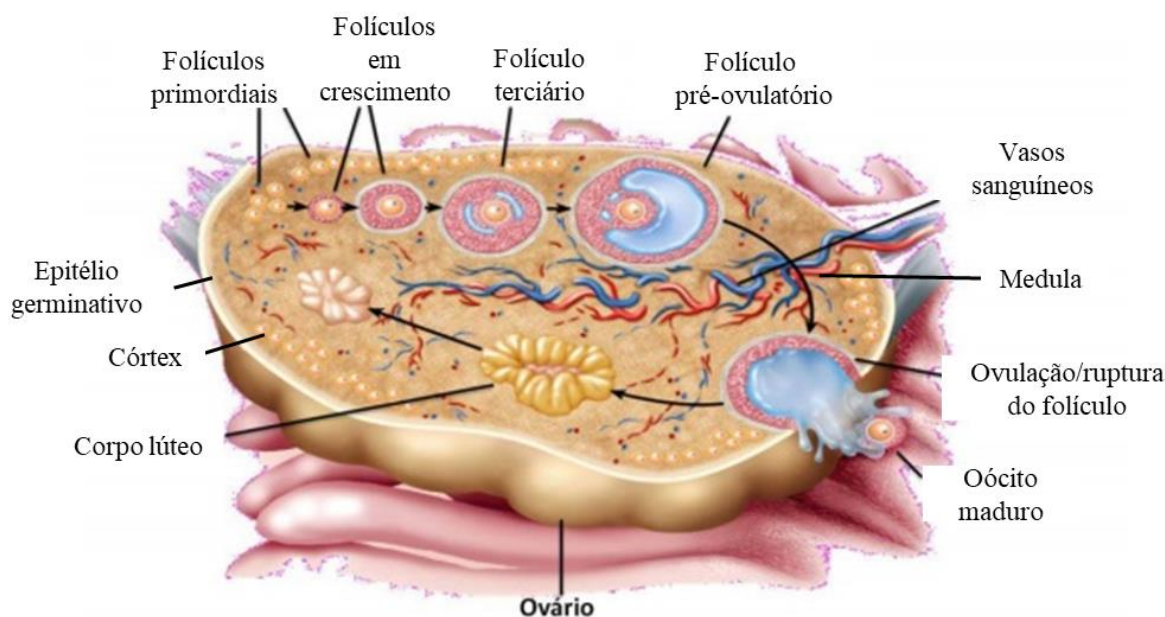
### 2.1. Oogênese e foliculogênese

O ovário é um órgão altamente dinâmico, que sofre inúmeras modificações estruturais e funcionais no decorrer do seu desenvolvimento e funcionalidade (RIMON-DAHARI et al., 2016; HUMMITZSCH et al., 2019). Do ponto de vista morfológico, o ovário pode ser dividido em três regiões: epitélio de revestimento, córtex e medula (SHAH et al., 2018). A região medular, localizada mais internamente, é constituída de fibras nervosas, vasos linfáticos e de tecido conjuntivo frouxo altamente vascularizado (AERTS; BOLS, 2010; MARTELLI et al., 2017). Folículos ovarianos são as unidades morfológicas e funcionais da biologia reprodutiva feminina e estão alojados no córtex ovariano, que é a parte periférica do ovário, envolto por uma única camada de epitélio germinativo e é constituído de tecido conjuntivo (estroma ovariano) (Figura 1) (AERTS; BOLS, 2010; MARTELLI et al., 2017; SHAH et al., 2018).

Cada folículo é composto por um único oócito cercado por camadas de células de suporte, como as células da granulosa e/ou células da teca, que protegem e nutrem o oócito em crescimento à medida que o folículo se desenvolve e torna-se apto para liberar um oócito maduro, pronto para fecundação (EL-HAYEK; CLARKE, 2016; SHAH et al., 2018; PRASASYA; MAYO, 2019). Os folículos ovarianos são importantes para apoiar a oogênese e também são essenciais para a produção de hormônios sexuais femininos, como o estradiol e a progesterona, que são responsáveis pelas características sexuais secundárias femininas e o início da gestação. Esta função caracteriza o ovário como uma glândula anffcrina (endócrina e exócrina) (RIMON-DAHARI et al., 2016; SHAH et al., 2018; HUMMITZSCH et al., 2019; WAGNER et al., 2020). A endocrinologia do ovário adulto é relativamente única, pois a regulação da sua secreção hormonal é determinada pela formação e regressão dos folículos e corpos lúteos (HUMMITZSCH et al., 2019). A formação e desenvolvimento dos oócitos e folículos ovarianos engloba os processos de oogênese e foliculogênese, respectivamente (FIGUEIREDO et al., 2018; FIGUEIREDO et al., 2008).



**Figura 1** - Desenho esquemático do ovário mamífero. (Adaptado de GONÇALVES, 2012).

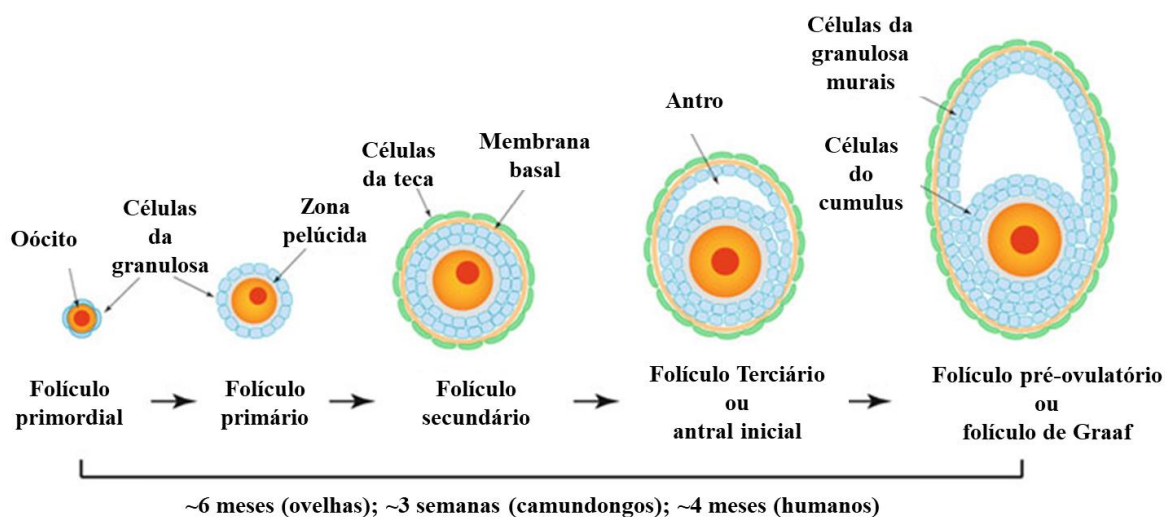


A oogênese é o processo de formação e diferenciação das células germinativas primordiais (CGP) até o estágio de oócito haploide fecundado. Inicia-se antes da foliculogênese, porém, este processo só termina após a foliculogênese (RÜSSE, 1983; LIM; CHOI, 2012). Durante o desenvolvimento embrionário, as CGP são estimuladas pela proteína morfogenética óssea (BMP) a migrarem para o local da futura gônada (RIMON-DAHARI et al., 2016). Em camundongos, uma das espécies utilizadas nessa Tese, as CGP continuam a proliferar por mitose até 13,5 dias após o acasalamento, formando grupos de células germinativas conhecidas como cistos ou ninhos (oogônias). Aproximadamente 5 dias após o parto, as oogônias sofrem a primeira divisão meiótica e se transformam em oócitos, que ficam parados no estágio de diplóteno, da meiose I, sendo chamados de oócitos primários ou imaturos (células  $2n$ ) (JAGARLAMUDI; RAJKOVIC, 2012; RIMON-DAHARI et al., 2016). O processo de formação dos oócitos primários é regulado negativamente pelo estradiol ( $E_2$ ) e pelo hormônio antimüleriano (AMH) e é controlado positivamente pela ativina, um membro da superfamília do fator de crescimento e transformação- $\beta$  (TGF- $\beta$ ); neurotrofinas (NT); fator de linhagem germinativa  $\alpha$  (Figl $\alpha$ ); Kit ligand (KL) e fator de transcrição Forkhead box L2 (FOXL2) (RIMON-DAHARI et al., 2016).

Somente após a fêmea atingir a maturação sexual 50 a 60 dias pós nascimento, os oócitos primários retomarão sua divisão meiótica para tornarem-se oócitos secundários haplóides (n) ou maduros e, assim, atingirem a segunda parada da meiose, na fase de metáfase II, na qual estão aptos a serem ovulados e fertilizados. Esta fase ocorre na puberdade, por volta da 5<sup>o</sup> semana de vida dos camundongos (HUTT; ALBERTINI, 2007; SÁNCHEZ; SMITZ, 2012). Desta forma, somente após a fecundação do oócito pelo espermatozoide ocorrerá a retomada da meiose novamente, originando o oócito haploide fecundado, marcando, assim, o fim da oogênese (FIGUEIREDO, 2008).

A oogênese e a foliculogênese de mamíferos compartilham uma conexão dinâmica e uma vez iniciadas, prosseguem de maneira coordenada e paralela (SHAH et al., 2018). A foliculogênese é um processo fisiológico de ativação, crescimento e maturação do folículo ovariano (RYBSKA et al., 2018; FIGUEIREDO et al., 2019), iniciando com a formação do folículo primordial até o estágio de folículo pré-ovulatório (Figura 2) (MARTELLI et al., 2017).

**Figura 2 – Desenho esquemático da foliculogênese, mostrando os diferentes tipos de folículos ovarianos** (Adaptado de El-Hayek; Clark, 2016).



Cada folículo primordial contém um oócito retido na prófase da primeira meiose, cercado por uma camada de células da pré-granulosa pavimentosas (RIMON-DAHARI et al., 2016; FINDLAY et al., 2019). Os folículos primordiais compõem a reserva ovariana e

foram descritos de várias formas como "adormecidos" ou "em repouso", embora os oócitos nesses folículos primordiais tenham um perfil metabólico ativo e o mecanismo de reparo de danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA) para proteger a integridade do genoma (FINDLAY et al., 2019).

Os folículos primários são formados quando ocorre a alteração na morfologia das células da granulosa pavimentosa para cúbicas, seguida da proliferação destas células. Estes eventos precedem o crescimento do oócito. Esse processo, denominado de ativação folicular, é iniciado por uma colaboração entre o oócito e as células da granulosa (FINDLAY et al., 2019; HARDY et al., 2018; KALLEN; POLOTSKY; JOHNSON, 2018). Na ativação folicular, o folículo primordial é acionado para sair da dormência e iniciar o crescimento folicular de maneira irreversível (SHAH et al., 2018). Estudos já demonstraram a participação de fatores de crescimento (fator de crescimento e diferenciação-9 [GDF-9]; proteína morfogenética óssea-15 [BMP-15]; fator de crescimento semelhante à insulina-1 [IGF-1]; proteína morfogenética óssea-7 [BMP-7]; fator inibidor de leucemia [LIF]; fator de crescimento fibroblástico-2 e 10 [FGF-2; FGF-10]; fator de crescimento e transformação beta [TGF- $\beta$ ] e KL), hormônios (hormônio folículo estimulante [FSH]; estradiol [E<sub>2</sub>]; progesterona [P<sub>4</sub>]; hormônio do crescimento [GH] e Deidroepiandrosterona) e vias de sinalização (fosfatidilinositol-3-quinase [PI3K]; alvo mamífero da rapamicina [mTOR]; FOXL2) na ativação folicular (revisado por SILVA; VAN DEN HURK; FIGUEIREDO, 2016; RIMON-DAHARI et al., 2016). Além disso, pesquisas também demonstraram a participação de antioxidantes, como o kaempferol e o resveratrol, na ativação folicular (BEZERRA et al., 2018; SANTOS et al., 2019a).

Na ativação de folículos primordiais, fatores de crescimento e antioxidantes, como KL e kaempferol, ativam a PI3K em oócitos (PANGAS, 2012; SANTOS et al., 2019a). Em mamíferos, a ativação está associada à perda de fosfatase e homólogo de tensina (PTEN) do oócito e translocação citoplasmática (exportação nuclear) de fator de transcrição Forkhead BOX O3 (FOXO3), componentes da via PI3K (JOHN et al., 2008; REDDY et al., 2008; BROMFIELD; SHELDON, 2013). Outra via de ativação folicular é a mTOR, que é uma quinase de serina/treonina que regula o crescimento e a proliferação celular em resposta a fatores de crescimento e nutrientes (REDDY et al., 2008). A mTOR pode atuar concomitantemente com a via PI3K, pois ativa a proteína quinase B (AKT), outro componente da via PI3K (ADHIKARI et al., 2010).

A transição do folículo primário para o folículo secundário é acompanhada pela proliferação de células da granulosa, formando duas ou múltiplas camadas, início da formação da zona pelúcida e surgimento das células da teca na camada mais externa do folículo (EL-HAYEK; CLARKE, 2016; RIMON-DAHARI et al., 2016; MARTELLI et al., 2017). Este evento é dependente da comunicação bidirecional entre o oócito e as células somáticas circundantes e muitas das moléculas de sinalização envolvidas neste evento pertencem à superfamília do TGF- $\beta$ , como a ativina, GDF-9 e BMP-15, além de NT, como a neurotrofina tipo 5 (NTF5) e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (RIMON-DAHARI et al., 2016).

Na vida pós-natal, são formados os folículos terciários (folículo antral inicial) e os folículos de Graaf (folículo pré-ovulatório) nos quais uma cavidade cheia de líquido folicular aparece como um reservatório rico em biomoléculas (EL-HAYEK; CLARKE, 2016; FREITAS et al., 2017; RYBSKA et al., 2018). Esse fluido, em alguns aspectos, é semelhante ao plasma e sua composição química contém uma mistura complexa de esteroides, metabólitos, polissacarídeos, proteínas, pequenos peptídeos, espécies reativas de oxigênio (ERO) e enzimas antioxidantes. Provavelmente, além de atuar diretamente como sinais celulares, a interação de muitas dessas moléculas, ou sua ausência, também contribuirá para o crescimento folicular adequado e a maturação do oócito (AMBEKAR et al., 2013; KUSHNIR et al., 2016; FREITAS et al., 2017).

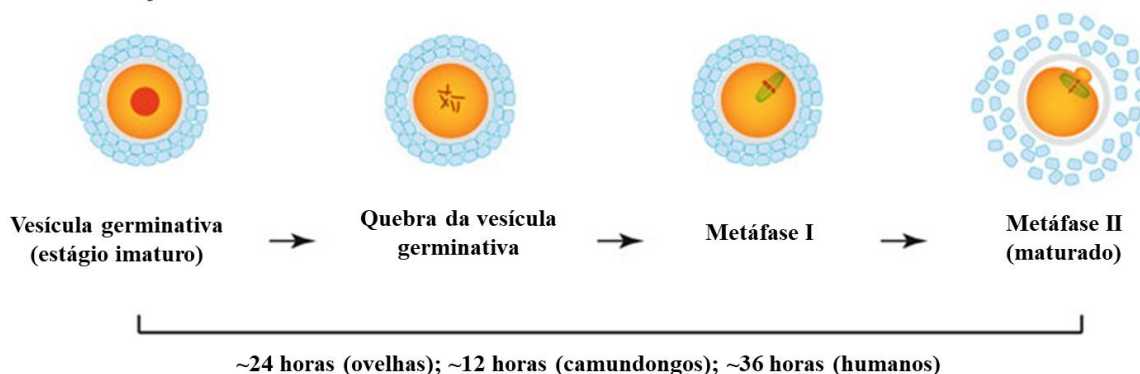
Alguns pesquisadores afirmam que o crescimento do oócito já está finalizado no estágio de folículo antral, antes da conclusão do desenvolvimento folicular (LI; CHIAN, 2017), pois perto do momento da formação da cavidade antral, há um aumento superior a 100 vezes no volume do oócito. Esse aumento está associado ao acúmulo de mitocôndrias e outras organelas, RNA mensageiro (RNAm) e proteínas que apoiarão o desenvolvimento embrionário precoce após a fecundação. O oócito em crescimento também passa por outras mudanças, incluindo o acúmulo de grânulos corticais, que desempenharão um papel importante e esse evento é chamado de maturação citoplasmática do oócito (SÁNCHEZ; SMITZ, 2012; EL-HAYEK; CLARKE, 2016).

A formação de folículos pré-ovulatórios depende da sinalização do FSH com o adenilato ciclase (AC), AMP cíclico (AMPc), proteína quinase A (PKA), PI3K e estradiol (RIMON-DAHARI et al., 2016). Nos folículos pré-ovulatórios, as células da granulosa são divididas em células murais (mais afastadas do oócito) e células do cúmulus, que juntamente

com o oócito, formam o complexo-cúmulus-oócito (EL-HAYEK; CLARKE, 2016; RYBSKA et al., 2018). O estágio final do desenvolvimento do oócito é a maturação nuclear, na qual o núcleo (vesícula germinativa) se decompõe e os cromossomos se condensam e formam o primeiro fuso meiótico (metáfase I). Em seguida, ocorre a primeira divisão meiótica e metade dos cromossomos são descartados no primeiro corpúsculo polar e os cromossomos que ficaram no oócito ficam alinhados no segundo fuso meiótico (metáfase II). Apenas após a fecundação do oócito, ocorrerá a conclusão da segunda divisão meiótica (CLARKE, 2017). Durante a maturação, em um processo denominado expansão do cúmulus, as células do cúmulus secretam proteínas que geram uma matriz extracelular que as separam umas das outras e do oócito para facilitar a fecundação (Figura 3) (EL-HAYEK; CLARKE, 2016).

**Figura 3** – Maturação nuclear do oócito. (Adaptado de El-Hayek; Clark, 2016).

### Maturação nuclear

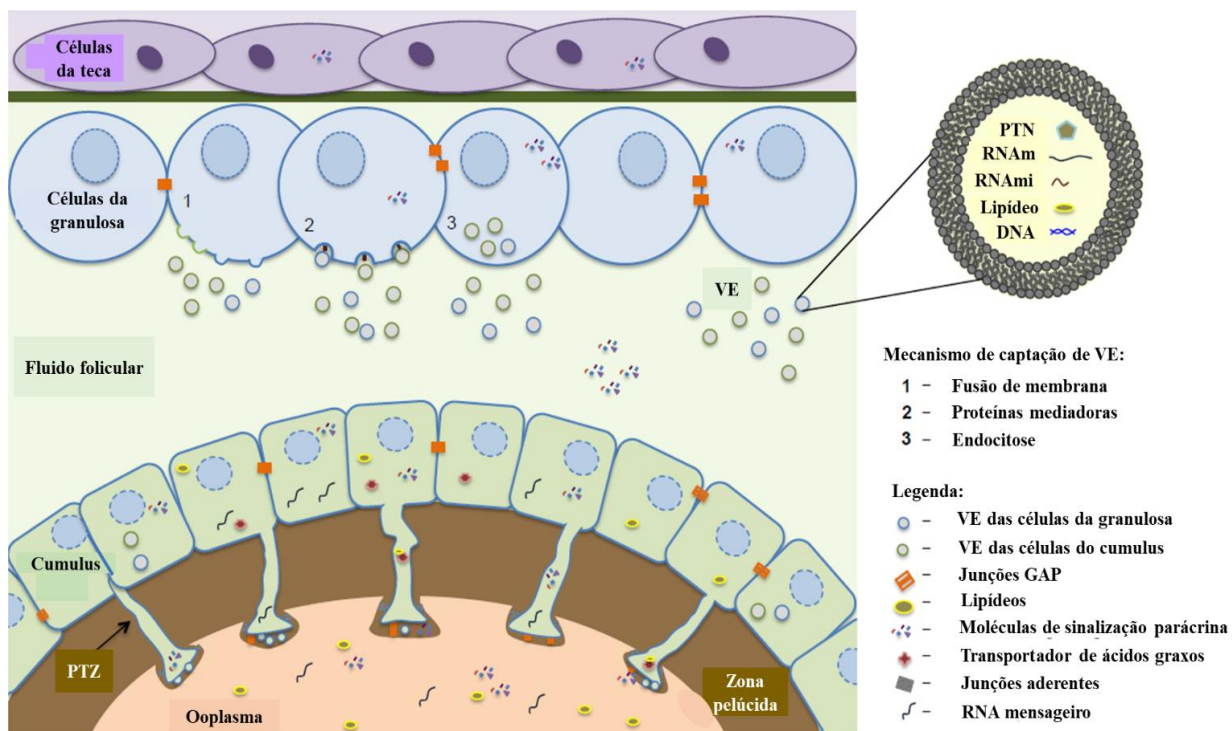


O aumento do hormônio luteinizante (LH) desencadeia a ovulação, enquanto as células da granulosa restantes sofrem diferenciação terminal para formar o corpo lúteo (CL) através da sinalização do LH com o AC, AMPc e PKA; PI3K/AKT; proteínas RAS (RAS); receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR); proteína quinase 3 ativada por mitógeno (MAPK3) e ERO (RIMON-DAHARI et al., 2016).

### **2.1.1. Comunicação entre oócito e células da granulosa durante a foliculogênese**

A interação complexa entre fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos, bem como a comunicação bidirecional entre os oócitos e as células foliculares são vitais para impulsionar a foliculogênese e a oogênese (FIGUEIREDO et al., 2018; HEILIGENTAG; EICHENLAUB-RITTER, 2018; ANDRADE et al., 2019). As células foliculares e os oócitos trocam moléculas sinalizadoras desde o início do desenvolvimento dos folículos primordiais até o momento da ovulação (EL-HAYEK; CLARKE, 2016; ANDRADE et al., 2019). A estrutura folicular se transforma durante a foliculogênese, pois formam-se barreiras entre a célula germinativa e as células foliculares somáticas. Dessa forma, os sistemas de comunicação precisam se adaptar para manter a troca de moléculas de sinalização. Duas barreiras críticas são estabelecidas em diferentes estágios de desenvolvimento: a zona pelúcida, separando os oócitos e células do cúmulus, limitando a comunicação por meio de conexões específicas, e o antro, separando subpopulações de células foliculares. Em ambas as situações, a comunicação é mantida pelo desenvolvimento de conexões especializadas como projeções transzonais, que são projeções citoplasmáticas que se estendem através da zona pelúcida; ou pela sinalização e tráfego parácrino de vesículas extracelulares (VE), contendo uma bicamada lipídica, através do fluido folicular (Figura 4) (ANDRADE et al., 2019).

**Figura 4** – Comunicação bidirecional no microambiente do folículo ovariano. PTZ: projeções transzonais; VE: vesículas extracelulares; PTN: proteína; RNAmi: microRNA. (Adaptado de Andrade, 2019).



Durante o crescimento, o folículo permite suporte metabólico ao oócito e este permite que o folículo atinja seu potencial esteroidogênico. Desta forma, a comunicação entre oócito e células da granulosa é importante, pois influencia várias etapas do desenvolvimento folicular e oocitário, como por exemplo, sincroniza o início do crescimento de oócitos com a ativação folicular (EL-HAYEK; CLARKE, 2016). Além disso, o crescimento dos folículos ovarianos antes da formação do antro é independente do FSH e é governado por vários modos de sinalização local. Após a ativação dos folículos primordiais, os oócitos começam a secretar GDF-9 e BMP-15, que atuam nas células da granulosa e são necessários para a diferenciação adequada dessas células, promovendo o crescimento e a expressão gênica, e também apoiam o metabolismo e a maturação das células do cúmulus (MONNIAUX, 2016; CLARKE, 2017; PRASASYA; MAYO, 2019). De uma maneira complementar, as células da granulosa secretam aminoácidos, nucleotídeos, microRNA, açúcares, piruvato e moléculas grandes como lipídeos, proteínas, RNAm e DNA para o oócito, para que ele complete seu crescimento, e essas substâncias conseguem entrar no citoplasma do oócito através de junções GAP e projeções transzonais (CLARKE, 2017; ANDRADE et al., 2019).

Durante os estágios finais do crescimento dos oócitos, é necessário GMP cíclico (GMPc), sintetizado pelas células da granulosa, e que é necessário para impedir a entrada precoce do oócito na maturação meiótica (nuclear). Finalmente, nos estágios iniciais da maturação, os sinais das células da granulosa promovem a síntese de um subconjunto de proteínas dentro do oócito que aumentam sua capacidade de se desenvolver como embriões (CLARKE, 2017).

## **2.2. População e atresia folicular**

Os ovários dos mamíferos contem milhares a milhões de folículos contendo oócitos imaturos (FIGUEIREDO; LIMA, 2017), sendo que esta população folicular difere entre as espécies e indivíduos, sendo de aproximadamente 160.000 em ovelhas, 1.500 em camundongas e aproximadamente de um a dois milhões em mulheres (DRIANCOURT, 1991; RICHARDS et al., 1998; SHAW; ORANRATNACHAI; TROUNSON, 2000). Entretanto, apenas uma pequena parte (0,01%) é capaz de se desenvolver até a ovulação, pois a grande maioria (99,9%) é perdida por um processo fisiológico denominado de atresia ou morte folicular, que não é igualmente prevalente em todos os estádios do desenvolvimento folicular (FIGUEIREDO et al., 2018; FIGUEIREDO; LIMA, 2017). A atresia regula a saúde e a qualidade dos oócitos, garantindo uma fecundação bem sucedida, e evita a chance de várias gestações em mulheres (KALA; SHAIKH; NIVSARKAR, 2017).

No folículo primordial, o processo de morte se origina no oócito, já nos folículos em crescimento, a atresia se origina nas células da granulosa e, subsequentemente, o oócito também é atingido (FINDLAY et al., 2019). A atresia folicular pode ocorrer pelas vias de necrose, necroptose, autofagia e apoptose (Figura 5) (CHAUDHARY et al., 2018; FINDLAY et al., 2019; ZHOU; PENG; MEI, 2019).

Tanto a necrose quanto a necroptose apresentam características morfológicas semelhantes e são caracterizadas por um aumento no volume celular, permeabilização e ruptura da membrana plasmática, que levam à morte celular (ZHOU; HAN; HAN, 2012; CHAUDHARY et al., 2018). Geralmente, a necrose é iniciada por mecanismos não celulares como isquemia, deficiência de níveis de adenosina trifosfato (ATP) e traumas, levando a danos irreversíveis na célula (MCCULLY et al., 2004). A necroptose é iniciada pelo fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e operada através das proteínas quinase-1 e 3, que interagem

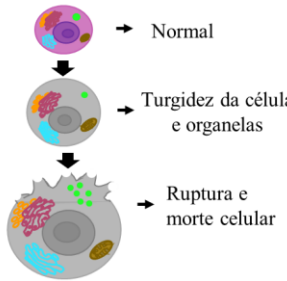
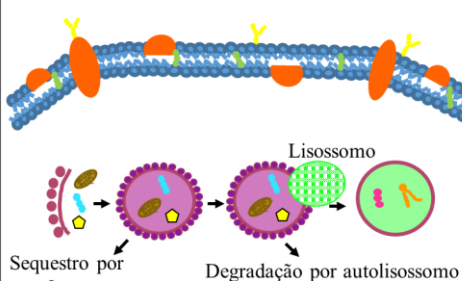
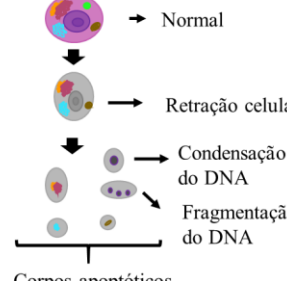


com seus receptores RIPK1 e RIPK3, respectivamente, bem como pela proteína do tipo domínio da quinase de linhagem mista (MLKL) (ZHOU; HAN; HAN, 2012; CHAUDHARY et al., 2018; ZHANG et al., 2020). A acetilcolinesterase, as citocinas e o estresse oxidativo também desempenham papéis importantes na morte da célula da granulosa mediada por necroptose (CHAUDHARY et al., 2018, 2019). A necroptose das células da granulosa pode privar o oócito de nutrientes, fatores de crescimento e fatores de sobrevivência. Sob essas condições, o oócito se torna mais suscetível à necroptose mediada por estresse oxidativo (CHAUDHARY et al., 2019).

A autofagia é um processo em que ocorre o sequestro de materiais celulares residuais, como proteínas e organelas danificadas, por autofagossomos, os quais, em seguida, se unem aos lisossomos que os degradam em monômeros reutilizáveis, como aminoácidos (LI et al., 2016, 2018). Essa via pode ser estimulada por várias formas de estresse celular, incluindo privação de nutrientes ou fator de crescimento, hipóxia, ERO, danos ao DNA, agregados de proteínas, organelas danificadas ou patógenos intracelulares (KROEMER; MARIÑO; LEVINE, 2010). Vários fatores, incluindo as vias PI3K/PKA/mTOR, transdução do sinal de cálcio, mitocôndrias e alteração de citoesqueleto, participam da regulação da autofagia durante o desenvolvimento folicular (ZHOU; PENG; MEI, 2019). O mTOR, localizado na membrana lisossomal, é o fator chave nesse processo (DUNLOP; TEE, 2014; SCHIRONE et al., 2017). A ativação das vias PI3K/AKT/mTOR ou da proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK)/mTOR pode inibir a resposta autofágica (PIRES et al., 2017). A autofagia em folículos pré-antrais ocorre principalmente em oócitos, enquanto que em folículos antrais, ocorre principalmente nas células da granulosa e está intimamente relacionada à apoptose celular (ZHOU; PENG; MEI, 2019). O acúmulo de autofagossomos induz a morte celular apoptótica das células da granulosa por meio da expressão reduzida de proteínas antiapoptóticas do linfoma de células B-2 (bcl-2) e subsequente ativação da caspase (CHOI et al., 2011).

Apoptose ou morte celular programada é um processo essencial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, sendo importante para eliminar células defeituosas. Durante a apoptose, a célula sofre alterações morfológicas, tais como retração celular, perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do DNA e formação dos corpos apoptóticos (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). Estes últimos, posteriormente serão fagocitados pelos macrófagos (SAIKUMAR et al., 1999).

**Figura 5** – Causas e características morfológicas observadas nos diferentes tipos de atresia. ATP: adenosina trifosfato; DNA: ácido desoxirribonucleico; TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa. (Arquivo pessoal).

	Necrose <sup>1</sup> e Necroptose <sup>2</sup>	Autofagia	Apoptose
C A U S A	Isquemia <sup>1</sup> Deficiência de ATP <sup>1</sup> Trauma direto na membrana <sup>1</sup>  $\uparrow$ TNF- $\alpha$ <sup>2</sup> Estresse oxidativo <sup>2</sup>	$\downarrow$ Nutrientes ou fatores de crescimento Hipóxia Estresse oxidativo Danos ao DNA e organelas Patógenos intracelulares	$\uparrow$ Moléculas pró-apoptóticas: Efetores e receptores de morte Citocromo c Caspases 3, 8 e 9
M O R F O L O G I A	 <p>Normal Turgidez da célula e organelas Ruptura e morte celular</p>	 <p>Sequestro por autofagossomo Lisossomo Degradação por autolisossomo</p>	 <p>Normal Retração celular Condensação do DNA Fragmentação do DNA Corpos apoptóticos</p>

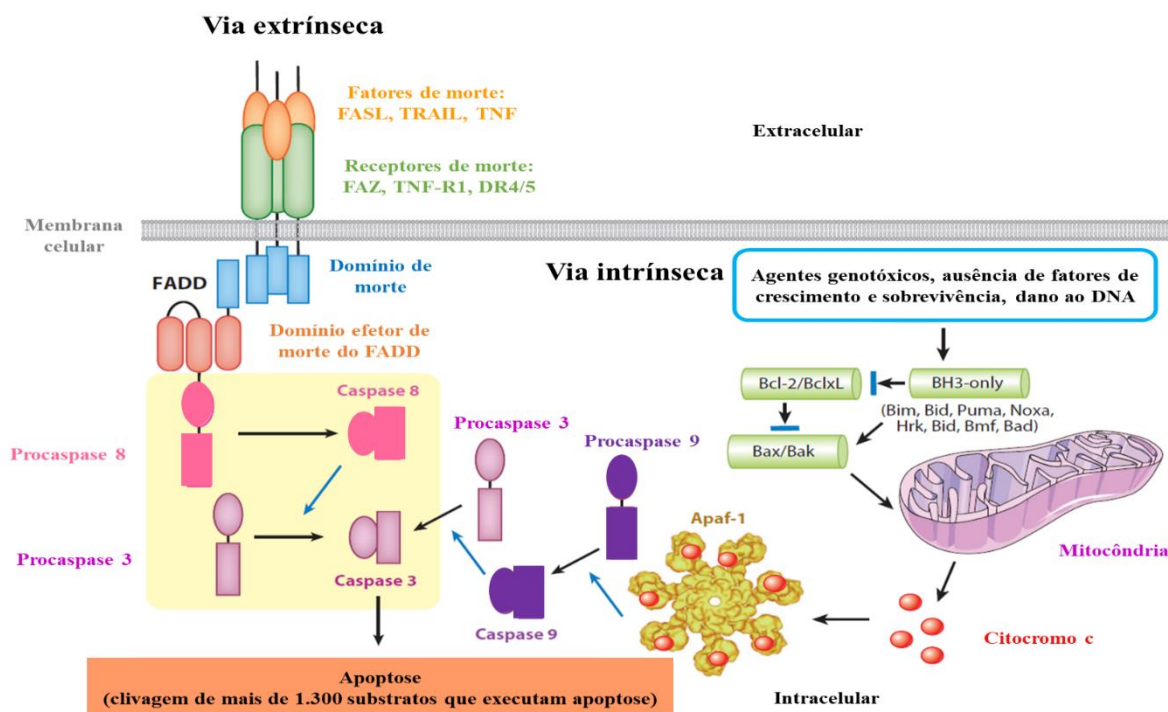
A apoptose é o principal responsável pela perda da reserva ovariana (GOUGEON, 2010). Muitas são as moléculas envolvidas no controle das vias de ativação da apoptose, dentre elas, estão as proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas, além das caspases (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). A ativação das caspases é um ponto chave para desencadear a apoptose. Estas podem ser ativadas por duas vias principais: a via extrínseca ou via do receptor de morte e pela via intrínseca ou via mitocondrial (Figura 6) (BEATTIE, 2007).

A via de apoptose extrínseca é desencadeada por fatores de morte da família TNF (ligante FASL; TNF- $\alpha$ ; ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF [TRAIL]) (KRAMMER, 2000; NAGATA, 1997, 2018; STRASSER; JOST; NAGATA, 2009). Esses fatores são sintetizados como proteínas de membrana tipo II com uma estrutura homotrimérica e podem ser clivadas a partir da membrana para gerar uma forma solúvel (BLACK et al., 1997; SCHULTE et al., 2007). A ligação de um fator de morte ao seu receptor específico (FasL – Fas; TNF-R1 – TNF; DR4/5 – TRAIL) gera o complexo de sinalização indutor de morte (DISC) e causa o processamento da procaspase-8 na caspase-8 ativa (iniciadora da apoptose). O DISC é formado por meio de associações homólogas entre os domínios de morte de FAS e proteína associada ao FAS com domínio da morte (FADD)

e entre os domínios efetores de morte (DED) de FADD e procaspase-8. A procaspase-8, 9 e 3 possuem dois DED autoassociados. A caspase-8 ativada cliva a pró-caspase-3 em caspase-3 ativada (efetora da apoptose) (NAGATA, 2018).

A via intrínseca, também chamada via mitocondrial, é regulada pelos membros da família bcl-2, que consiste em três subfamílias: membros pró-apoptóticos como as proteínas BH3 (Bim, Bid, Puma, Noxa, Hrk, Bmf e Bad), moléculas efetoras pró-apoptóticas (Bax e Bak) e proteínas anti-apoptóticas da família bcl-2 (bcl-2, bcl-XL, Mcl1, A1 e bcl-B) (CZABOTAR et al., 2014). Em células saudáveis, a ação de Bax/Bak é interrompida por membros anti-apoptóticos da família bcl-2. Em resposta a um estímulo apoptótico (falta de fator de crescimento ou de sobrevivência ou ação de agentes genotóxicos), as proteínas BH3 são ativadas e agem indiretamente antagonizando bcl-2 anti-apoptótica, ou diretamente induzindo Bax/Bak a estimular a liberação do citocromo c pelas mitocôndrias. O citocromo c se liga ao fator de ativação 1 da protease apoptótica (APAF-1) para formar um complexo cuja função é mediar a conversão da procaspase-9 em caspase-9 ativada (iniciadora da apoptose). A caspase-9 ativada ativa a caspase-3 ativada, que cliva mais de 1.300 substratos celulares para executar a apoptose (Figura 6) (YUAN; AKEY, 2013; ZHOU et al., 2015; NAGATA, 2018).

**Figura 6** – Transdução de sinal de apoptose nas vias extrínseca e intrínseca. Setas pretas indicam conversão direta, enquanto setas azuis indicam ações catalíticas. Apaf-1: fator de ativação 1 da protease apoptótica; Bak e Bax: proteínas pró-apoptóticas efetoras semelhantes ao BCL-2 sem o domínio BH4; BH3: membros pró-apoptóticos da família Bcl-2; Bcl-2: proteína do linfoma de células B-2; BclxL: proteína do linfoma extra grande de células B; Bim, Bid, Puma, Noxa, Hrk, Bmf e Bad: proteínas pró-apoptóticas BH3-apeenas; DR4/5: receptor de morte específico do TRAIL; FADD: proteína associada ao FAS com domínio da morte; FAS: receptor de morte específico do FASL; FASL: ligante de morte FASL; TNF: fator de necrose tumoral; TNF-R1: receptor do TNF; TRAIL: ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF. (Adaptado de NAGATA, 2018).



O estresse oxidativo desencadeia várias vias de morte celular no ovário como apoptose, autofagia e necroptose (CHAUDHARY et al., 2019). Dessa forma, para evitar a atresia, é necessário que haja um estado oxidativo e um metabolismo energético adequados no folículo.

### 2.3. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

As ERO são átomos, moléculas ou quaisquer compostos que contenham um ou mais elétrons desemparelhados. Biologicamente, as ERO mais relevantes são derivadas a partir de oxigênio e nitrogênio, e seus principais representantes são o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ),

peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e hidroxil ( $\bullet OH$ ) (SURAI, 2006; LU et al., 2018). Elas são geradas pelo metabolismo energético normal e desempenham um papel importante como mensageiros secundários em muitas cascatas de sinalização intracelular. A produção excessiva de ERO desencadeia reações descontroladas com compostos intracelulares não-alvos, como os ácidos nucleicos, proteínas de membrana, outras proteínas e lipídeos (STEFANSON; BAKOVIC, 2014; LU et al., 2018).

As ERO influenciam os folículos e os oócitos. O aumento do hormônio luteinizante (LH) inicia um recrutamento massivo de ERO que modula as principais funções reprodutivas como maturação de oócitos, esteroidogênese, função do corpo lúteo e luteólise. Antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, vitaminas e minerais, estão presentes nos folículos e protegem os oócitos dos efeitos prejudiciais da ERO. Por isso, a superprodução de ERO com a concomitante diminuição de antioxidantes leva ao estresse oxidativo que afeta a qualidade dos oócitos (KALA; SHAIKH; NIVSARKAR, 2017; WANG et al., 2017a). Um estudo recente demonstrou que o aumento dos níveis de ERO nas células da granulosa induziu a apoptose celular e afetou negativamente a qualidade do oócito e a gestação em mulheres com síndrome do ovário policístico (SOP) (LAI et al., 2018).

O óxido nítrico (NO, monóxido de nitrogênio), uma espécie reativa de nitrogênio (ERN), é uma das menores moléculas sintetizadas no sistema biológico. Além de seu papel na angiogênese, função neuronal e resposta inflamatória, o NO tem amplo significado na regulação da função ovariana. A ligação seletiva de NO com proteínas contendo porções heme tem influência significativa na esteroidogênese ovariana em mamíferos (PANDEY et al., 2010; NATH; MAITRA, 2019).

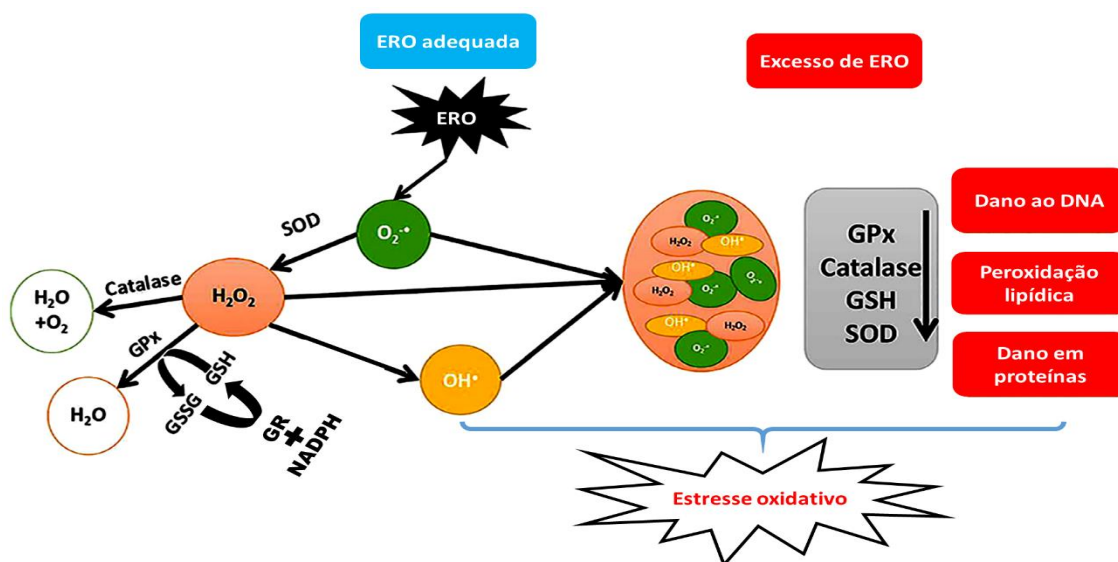
Nesse contexto, sabe-se que o desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes, ou seja, o estresse oxidativo causado por ERO e/ou ERN tem um papel importante nas doenças reprodutivas femininas, incluindo SOP, endometriose, pré-eclâmpsia e o câncer (SOSA et al., 2013; LU et al., 2018). Adicionalmente, a exposição aguda a antineoplásicos, como ciclofosfamida, doxorrubicina ou cisplatina desencadeia a apoptose de oócitos de folículos primordiais dentro de 12-24 horas, resultando na perda maciça de reserva ovariana por vários mecanismos, dentre eles o estresse oxidativo (NGUYEN et al., 2019; SZYMANSKA; TAN; OKTAY, 2020). Dessa forma, é essencial que haja um sistema de defesa antioxidante eficiente para manter o processo oxidativo dentro dos limites fisiológicos e passíveis de

regulação, impedindo que os danos oxidativos se amplifiquem, culminando em danos sistêmicos irreparáveis.

#### **2.4. Antioxidantes**

O organismo possui alguns mecanismos para manter o equilíbrio redox nas células pela produção de substâncias que podem ser enzimáticas ou não enzimáticas. As defesas enzimáticas mais relevantes são: a superóxido dismutase (SOD) que catalisa a conversão do superóxido em peróxido de hidrogênio, a catalase (CAT) que converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, e a glutathione peroxidase (GPX) que destrói o peróxido de hidrogênio, mas, para isso, depende da glutathione reduzida (GSH), que sofre oxidação e converte-se em glutathione oxidada (GSSG) (Figura 7) (LU et al., 2018). Por sua vez, a glutathione reductase (GR) regula os níveis de GSH ao reduzir a GSSG em GSH através da oxidação pelo fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida H<sup>+</sup> (NADPH), proveniente da via das pentoses. Todo esse processo é chamado de "reciclagem de GSH" e é de fundamental importância para a capacidade de eliminação oxidante das células (WANG et al., 2017a). Além disso, existem outras moléculas antioxidantes não enzimáticas, que podem ser produzidas pela própria célula (GSH, coenzima Q, ácido úrico, o ácido lipóico e a bilirrubina) ou obtidas pela dieta (vitamina C, E, A, etc.) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

**Figura 7.** Representação esquemática demonstrando as consequências entre o equilíbrio e o desequilíbrio entre ERO e importantes vias antioxidantes enzimáticas celulares. ERO: espécies reativas de oxigênio; GSH: glutatona reduzida; GSSG: glutatona oxidada; GPX: glutatona peroxidase; GR: glutatona redutase; H<sub>2</sub>O: água; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio; NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; O<sub>2</sub>: superóxido; OH<sup>•</sup>: hidroxil; SOD: superóxido dismutase. (Adaptado de LU *et al.*, 2018).



#### 2.4.1. Defesa antioxidante no ovário

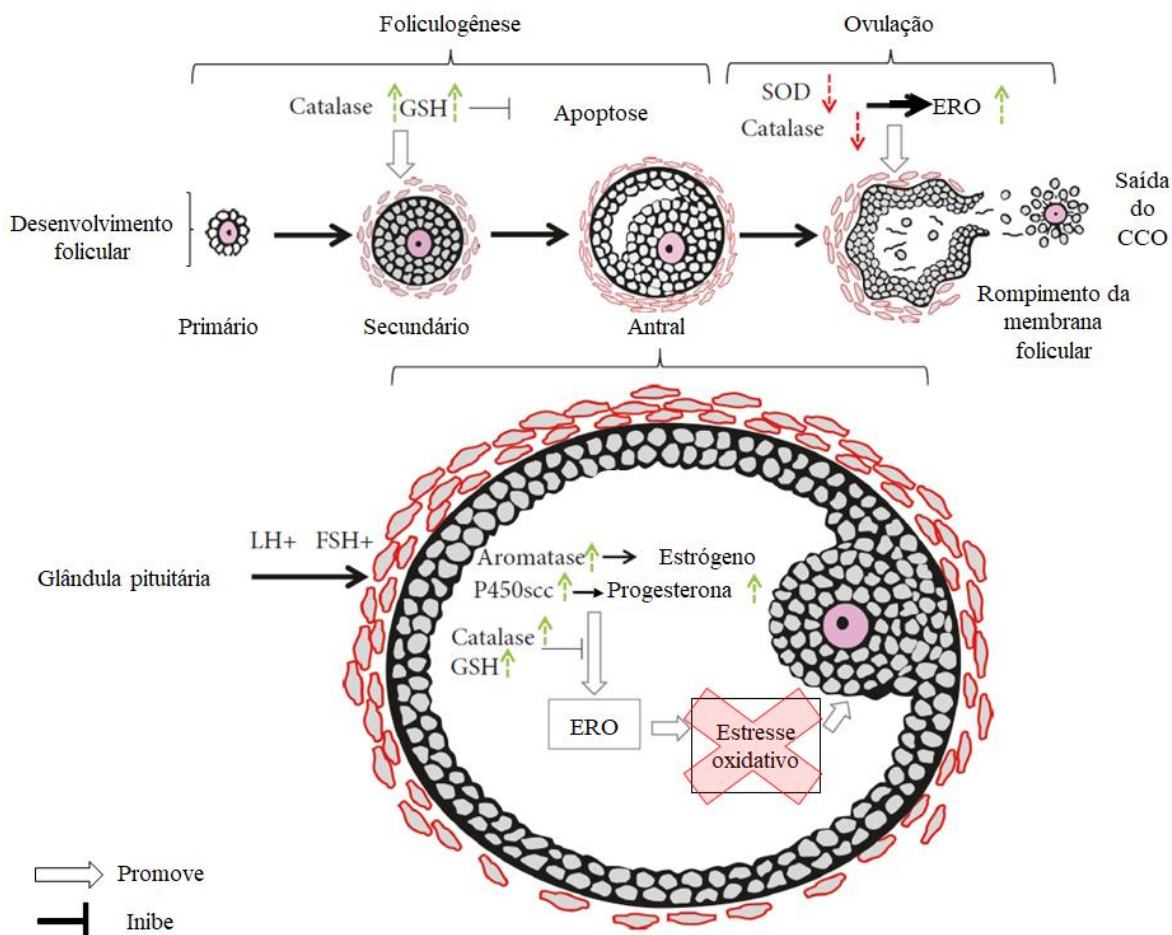
Tal como em outros tecidos, a defesa antioxidante celular do ovário é composta por uma série de enzimas citoplasmáticas e mitocondriais (MENG *et al.*, 2016). Assim, o sistema antioxidante da célula viva inclui três níveis principais de defesa. O primeiro nível é responsável pela prevenção da formação de ERO através da remoção de precursores das mesmas ou por catalisadores de inativação e consiste de três enzimas antioxidantes principais como SOD, GPX e CAT, além de proteínas de ligação a metais, como a transferrina (SURAI; FISININ; KARADAS, 2016; LU *et al.*, 2018). Em seguida, o segundo nível de defesa consiste em antioxidantes que previnem a peroxidação lipídica por eliminar radicais peróxidos, sendo composto pela vitamina E, coenzima Q, carotenóides, vitamina A, ácido ascórbico, ácido úrico e alguns outros antioxidantes, como a GSH e tioredoxina. No entanto, tanto o primeiro como o segundo nível de defesa antioxidante na célula podem não ser capazes de prevenir os efeitos prejudiciais da ERO sobre os lipídeos, proteínas e DNA. Neste caso, o terceiro nível de defesa baseia-se em sistemas para eliminar moléculas

danificadas ou repará-las. Este nível inclui enzimas lipolíticas (lipases), proteolíticas (peptidases ou proteases) e outras enzimas (enzimas de reparo do DNA, ligases, nucleases, polimerases, proteinases, fosfolipases e transferases). Todos estes antioxidantes funcionam no organismo, em associação uns com os outros, formando um sistema antioxidante integrado (SURAI; FISININ; KARADAS, 2016).

Uma grande quantidade de ERO pode ser produzida durante a esteroidogênese, especialmente, durante a conversão de colesterol em pregnenolona. Neste caso, a CAT e a GSH protegem os oócitos do estresse oxidativo gerado pelos processos metabólicos fisiológicos, como a esteroidogênese no ovário. Entretanto, ao final do desenvolvimento folicular, ocorre uma redução das enzimas antioxidantes e um aumento de ERO que irão contribuir para que ocorra o rompimento da membrana basal do folículo pré-ovulatório e, em consequência, a ovulação (Figura 8) (WANG et al., 2017a).



**Figura 8.** Representação esquemática da regulação antioxidante no desenvolvimento folicular. CCO: complexo cumulus-oócito. ERO: espécies reativas de oxigênio; GSH: glutationa; FSH: hormônio folículo estimulante; LH: hormônio luteinizante; P450<sub>scc</sub>: citocromo P450; SOD: superóxido dismutase. (Adaptado de WANG *et al.*, 2017a).



#### 2.4.2. Antioxidantes naturais

Uma variedade de materiais vegetais são conhecidos por serem fontes naturais de antioxidantes, como ervas, especiarias, sementes, frutas e vegetais (LOURENÇO; MOLDÃO-MARTINS; ALVES, 2019). Existem várias classes de compostos fenólicos como ácidos fenólicos, flavonoides, lignanas, estilbenos e taninos, mas os flavonoides são os mais estudados por serem os compostos mais comuns e disponíveis nos vegetais (AMAROWICZ; PEGG, 2019). Suas estruturas básicas consistem em anéis C6-C3-C6 com diferentes padrões de substituição para produzir uma série de compostos de subclasse, como flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, flavanóis ou catequinas e antocianinas. Muitos

flavonoides apresentam atividade antioxidante, cardioprotetora, antidiabética, anti-inflamatória, antialérgica, enquanto alguns outros apresentam atividade antiviral. Mais recentemente, os flavonoides foram comprovados como eficazes agentes anticâncer, por meio da indução da parada do ciclo celular, apoptose e inibição de enzimas-chave envolvidas na promoção de tumores (proliferação celular) (KARAK, 2019). Dessa forma, são considerados suplementos alimentares que promovem a saúde e previnem doenças e, atualmente, são considerados componentes indispensáveis em uma variedade de aplicações nutraceuticas, farmacêuticas, medicinais, cosméticas e gonadoprotetoras (GOUVEIA et al., 2020; KARAK, 2019; LOURENÇO; MOLDÃO-MARTINS; ALVES, 2019).

#### 2.4.3. Estudos *in vitro* e *in vivo* testando o efeito de antioxidantes naturais em folículos ovarianos

Muitos extratos vegetais e/ou seus metabólitos secundários possuem ação antioxidante em folículos ovarianos, como o extrato vegetal de *Spirulina maxima*, que foi responsável pelo desenvolvimento de folículos pré-antrais suínos sem apresentar citotoxicidade (PLAZAS, 2015). Outros trabalhos utilizam extratos de plantas, como o extrato do pólen da palmeira (*Phoenix dactylifera*) associado ao meio de cultivo de folículos secundários isolados de murinos, que melhorou o crescimento folicular e a maturação oocitária (ABDOLLAHI et al., 2015), e os extratos de *Amburana cearensis* e *Morus nigra*, que promoveram ativação folicular e redução da apoptose após 7 dias de cultivo de tecido ovariano ovino (GOUVEIA et al., 2019; MENEZES et al., 2018). Em outro estudo, a adição do extrato hidroetanólico de própolis vermelha ao meio de cultivo *in vitro* de folículos isolados ovinos aumentou a formação de antro, a atividade mitocondrial e os níveis de GSH (NASCIMENTO et al., 2019). Após cultivo de tecido ovariano ovino por 7 dias, seguido de isolamento de folículos secundários e cultivo destes por mais 6 dias, o extrato de *Justicia insularis* manteve a viabilidade folicular, promoveu a ativação e o crescimento, bem como a formação da cavidade antral (MBEMYA et al., 2019). A administração de extrato de *Senecio bialfrae* durante 20 dias em ratas, aumentou os níveis de estradiol e progesterona e o número de folículos em crescimento (primário, secundário e terciário). Além disso, o uso desse mesmo extrato no cultivo de tecido ovariano suíno por 7 dias, manteve a sobrevivência folicular (LIENOU et al., 2020).

Há ainda estudos que utilizam proteínas de origem vegetal durante o cultivo *in vitro*, como as lectinas concanavalina A ou jacalina, associadas ao FSH. Essas lectinas promoveram a ativação de folículos primordiais e regularam a expressão gênica após 6 dias de cultivo de tecido ovariano caprino (PORTELA et al., 2014; RIBEIRO et al., 2015).

Além disso, o resveratrol, um antioxidante encontrado na casca de uva e amora, promoveu a ativação de folículos primordiais, reduzindo a fragmentação do DNA e estimulou a proliferação de células da granulosa através da ativação da via PI3K após o cultivo de tecido ovariano ovino (BEZERRA et al., 2018). Da mesma forma, a rutina (0,1 µg/mL) e o kaempferol (1 µM), apresentaram atividade antioxidante no cultivo de folículos secundários ovinos durante 12 dias, podendo substituir outros três antioxidantes presentes no meio de cultivo: transferrina, selênio e ácido ascórbico (LINS et al., 2017; SANTOS et al., 2019b). A suplementação com eugenol no meio de cultivo de folículos secundários bovinos promoveu a manutenção da morfologia e viabilidade folicular, aumentou o diâmetro folicular e os níveis de mRNA da glutatona peroxidase 1 (VASCONCELOS et al., 2021). De maneira geral, sabemos que os antioxidantes combatem as ERO, e como grande parte das ERO são formadas nas mitocôndrias, essa organela também necessita ser estudada com mais atenção.

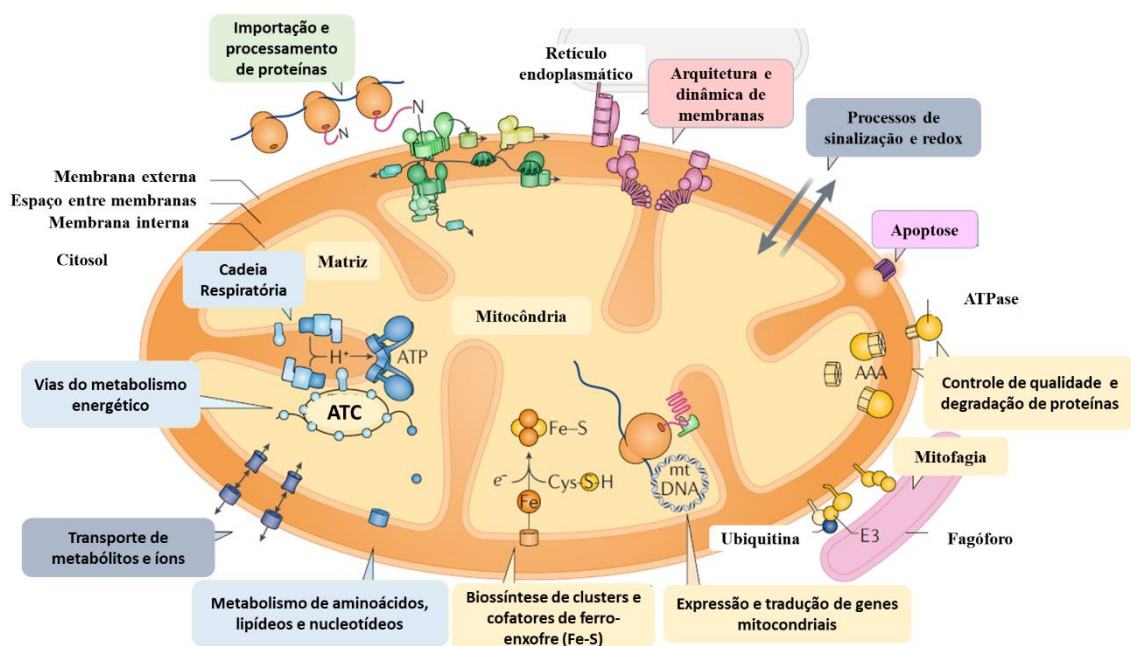
## **2.5. Mitocôndrias e metabolismo energético celular**

As mitocôndrias consistem em quatro compartimentos: membrana externa, espaço intermembranar, membrana interna e matriz. Elas são de origem materna e são mais conhecidas por sintetizarem a maior parte da energia celular em forma de adenosina trifosfato (ATP) através do processo de fosforilação oxidativa (WANG et al., 2017b; PFANNER; WARSCHEID; WIEDEMANN, 2019). O sistema de fosforilação oxidativa mitocondrial é a via metabólica na qual as células usam enzimas para oxidar nutrientes, liberando energia, que é usada para produzir ATP. A fosforilação oxidativa depende da atividade de cinco complexos multi-enzimáticos embutidos na membrana mitocondrial interna e de dois portadores de elétrons móveis, a coenzima Q10 e o citocromo c, coletivamente denominados de cadeia transportadora de elétrons. O sistema de fosforilação oxidativa acopla o fluxo de elétrons à translocação de prótons através da membrana mitocondrial interna, gerando um gradiente eletroquímico entre a matriz mitocondrial e o espaço intermembranar, o que alimenta a síntese de ATP (WANG et al., 2017b).

Além de atuar no metabolismo energético com respiração e síntese de ATP, as mitocôndrias estão envolvidas em outras funções celulares como metabolismo de aminoácidos, lipídios e nucleotídeos; biossíntese de cofatores de ferro-enzofre; expressão do genoma mitocondrial; processos de controle de qualidade e degradação de proteínas; mitofagia e apoptose; processos de sinalização e redox; e a importação e processamento de proteínas precursoras que são sintetizadas nos ribossomos citosólicos (Figura 9) (ROTH, 2018; PFANNER; WARSCHEID; WIEDEMANN, 2019).

Além disso, as mitocôndrias geram grande parte das ERO endógenas, um subproduto potencialmente tóxico da fosforilação oxidativa. Essas organelas também integram os poros de transição da permeabilidade mitocondrial que iniciam a morte celular quando a função de energia mitocondrial diminui. Portanto, a ineficiência no sistema de fosforilação oxidativa pode resultar na geração de altos níveis de ERO, o que pode levar à anormalidade celular (TILLY; SINCLAIR, 2013).

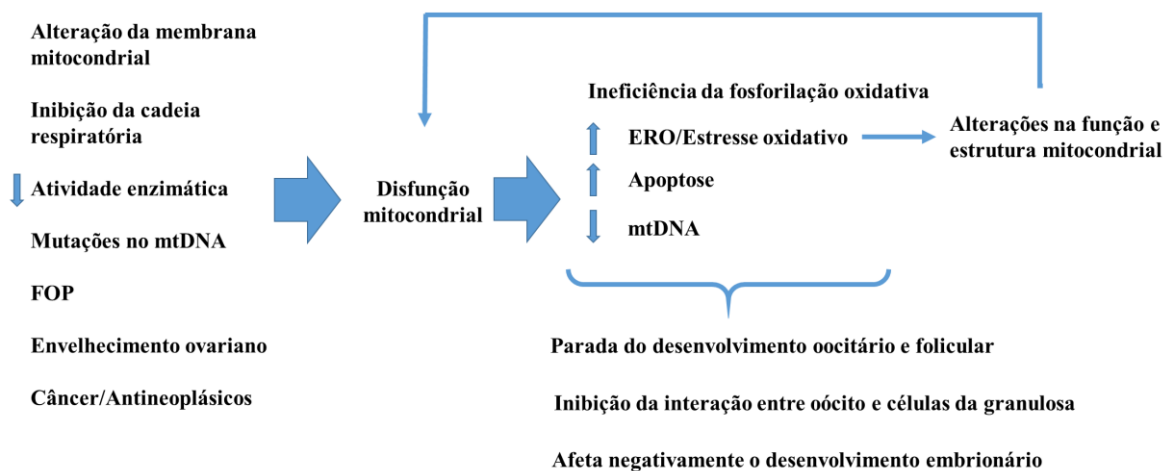
**Figura 9.** Estrutura e funções da mitocôndria. ATP: adenosina trifosfato; ATC: ácido tricarbóxico; DNAm: DNA mitocondrial; E3: proteína ligase de ubiquitina; AAA: proteases de AAA (ATPases). (Adaptado de PFANNER *et al.*, 2019).



Especificamente no ovário, as mitocôndrias têm um papel importante na esteroidogênese realizada pelas células da granulosa e da teca. A esteroidogênese inicia com o transporte de colesterol da membrana mitocondrial externa para a membrana mitocondrial interna pela proteína reguladora aguda de esteroides (STAR) e outras proteínas acessórias (STOCCO, 2001). Uma vez dentro da mitocôndria, o colesterol é metabolizado em pregnenolona pelo citocromo P450 (CYP11A1, também conhecido como P450SCC), que é posteriormente metabolizado no retículo endoplasmático para formar os hormônios esteroides como produtos finais, incluindo estradiol e progesterona (CHIEN; ROSAL; CHUNG, 2017; TAKAE; SUZUKI, 2017). Em oócitos, as mitocôndrias permanecem em um estado de relativamente baixa atividade, porém suficiente para fornecer a quantidade certa de energia para a célula, minimizando a frequência de mutações no DNA mitocondrial e a produção de ERO (LEESE et al., 2016). No entanto, oócitos e embriões de mamíferos em estágio inicial de clivagem são criticamente dependentes de aproximadamente 100.000 mitocôndrias para se desenvolverem desde a ovulação até o estágio de mórula. Eles dependem quase exclusivamente da fosforilação oxidativa de vários substratos intracelulares como piruvato, ácidos graxos e glutamina para a produção de ATP (BRADLEY; SWANN, 2019; MALOTT; LUDERER, 2021). Dessa maneira, é fácil entender porque os oócitos maduros contêm o maior número de mitocôndrias entre os diferentes tipos celulares (KAM et al., 2013; POLYAK et al., 1998).

Em condições fisiológicas, as ERO produzidas pelas mitocôndrias são essenciais para a maturação oocitária. No entanto, o desequilíbrio entre a produção de ERO e capacidade antioxidante pode causar efeitos deletérios sobre o oócito, induzindo dano ao DNA mitocondrial, e em consequência disso, apoptose celular (LARSSON, 2010; ROTH, 2018). Além disso, a destruição da membrana mitocondrial, inibição da cadeia respiratória, diminuição da atividade enzimática, mutações no DNA mitocondrial e outros fatores que causam distúrbios no metabolismo energético como falha ovariana prematura, envelhecimento ovariano, câncer e seu tratamento com antineoplásicos levam à disfunção mitocondrial (Figura 10) (WANG et al., 2017b; ZHANG et al., 2019; ZENG et al., 2020) e consequentemente, afetam as funções reprodutivas da fêmea.

**Figura 10.** Causas e consequências da disfunção mitocondrial no ovário. FOP: falha ovariana prematura; ERO: espécies reativas de oxigênio; mtDNA: DNA mitocondrial. (Arquivo pessoal).



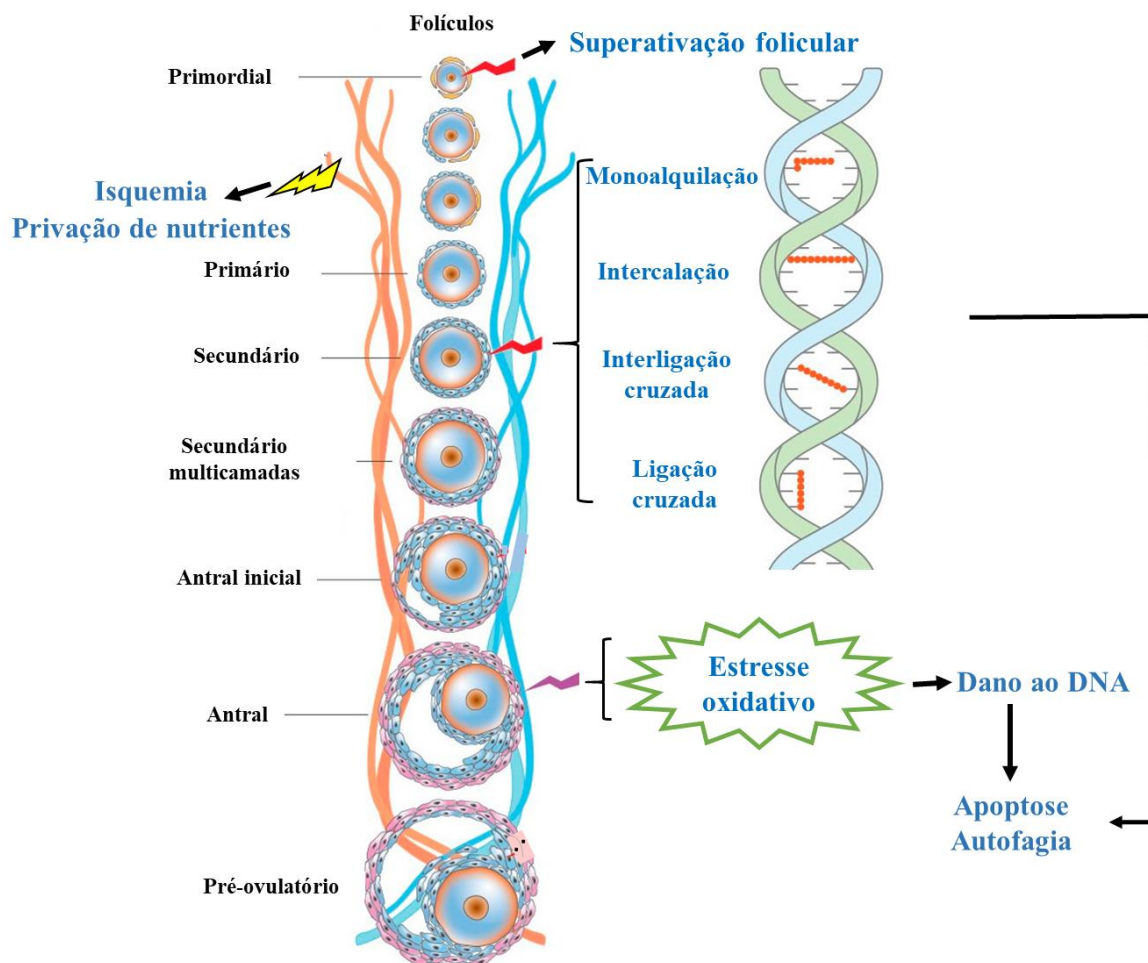
## 2.6. Câncer e fertilidade

No tratamento contra o câncer, é muito frequente a avaliação das funções cardíaca, pulmonar, renal e hepática durante e após o tratamento. Porém, infelizmente, o mesmo não se aplica ao sistema reprodutivo. A taxa de sobrevivência nos últimos cinco anos para o câncer infantil é superior a 80%, aumentando o número de mulheres jovens que enfrentam infertilidade no futuro devido aos efeitos gonadotóxicos da quimioterapia e da radiação. Embora os pacientes e os médicos devam se concentrar inicialmente no diagnóstico do câncer, a paciente e sua família devem ser amplamente aconselhadas para a preservação da fertilidade. Por isso, é essencial antecipar os efeitos adversos do tratamento contra o câncer e oferecer opções ao paciente no sentido de proteger a função ovariana (ALGARROBA; SANFILIPPO; VALLI-PULASKI, 2018; FELICE et al., 2018; AKASHA; WOODRUFF, 2019).

Uma das formas de tratar o câncer é pela quimioterapia, entretanto, a mesma induz a depleção folicular ovariana precoce e subsequente infertilidade, pois atua de forma não específica para células cancerosas. Os mecanismos envolvidos nesse dano iatrogênico indesejável no ovário têm sido intensivamente estudados, mas muitos deles ainda não estão claros. Vários medicamentos antineoplásicos induzem danos diretos e indiretos ao DNA como indução de quebras de fita dupla de DNA e/ou estresse oxidativo celular, que são frequentemente seguidos por apoptose e/ou autofagia, bem como danos à rede de microvasos

no estroma ovariano, levando ao estresse celular, como isquemia e privação de nutrientes contribuindo para a disfunção ovariana (Figura 11). Outro mecanismo proposto para a depleção dos folículos ovarianos é a superativação de folículos primordiais do *pool* de reserva para folículos em crescimento. No entanto, os dados experimentais atuais ainda são inconsistentes e controversos em relação a esses efeitos (MEIROW et al., 2007; BAR- JOSEPH et al., 2011; HAO et al., 2019; SONIGO et al., 2019; SZYMANSKA; TAN; OKTAY, 2020). Além disso, sabe-se que os antineoplásicos podem causar efeitos gonadotóxicos interrompendo processos celulares básicos, interferindo na proliferação celular (SOLEIMANI et al., 2011). Por isso, a realização da imuno-histoquímica do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) após a quimioterapia é tão importante.

**Figura 11.** Mecanismos propostos de dano ovariano induzido por quimioterapia e depleção folicular. (Modificado de HAO *et al.*, 2019).



**Legenda:**

- Dano direto do antineoplásico por superativação ou modificações no DNA
- Dano indireto do antineoplásico por estresse oxidativo
- Dano indireto do antineoplásico pela rede de microvasos
- Consequência

## 2.7. Uso de biotecnologia reprodutiva para promover o desenvolvimento folicular *in vitro* ou para preservação da fertilidade contra agentes citotóxicos no ovário

O cultivo de tecido ovariano representa uma excelente ferramenta para aprimorar nossa compreensão sobre o controle da foliculogênese inicial (FIGUEIREDO *et al.*, 2019). Diversos estudos já mostraram que uma variedade de substâncias podem agir na



sobrevivência, ativação de folículos primordiais e/ou crescimento folicular, como extratos de plantas (*Amburana cearensis*: MENEZES et al., 2018; *Morus nigra*: GOUVEIA et al., 2019; *Justicia insularis*: MBEMYA et al., 2019; *Senecio bialfrae*: LIENOU et al., 2020), proteínas de origem vegetal (concanavalina A: PORTELA et al., 2014; jacalina: RIBEIRO et al., 2015), fatores de crescimento (FGF-2: SANTOS et al., 2014; GDF-9: MONTE et al., 2021) e antioxidantes (kaempferol: SANTOS et al., 2019a; resveratrol: BEZERRA et al., 2018; epigallocatequina-3-galato: BARBERINO et al., 2020). Depois de compreender quais fatores e como eles estão envolvidos no início da foliculogênese, principalmente, através do cultivo de tecido ovariano, será possível otimizar o uso de oócitos oriundos da reserva ovariana através de outras técnicas de reprodução assistida em humanos (FIGUEIREDO et al., 2019) com a fertilidade comprometida, como as que precisaram passar por tratamento contra o câncer.

Sabe-se que diversas terapias para preservação da fertilidade têm sido desenvolvidas para mulheres entre 18 e 40 anos com diagnóstico de câncer (LA ROSA et al., 2020). A estimulação ovariana com gonadotrofinas, a criopreservação ou a vitrificação de folículos, oócitos e/ou embriões; o cultivo de folículos ovarianos isolados e a maturação oocitária *in vitro* podem fornecer potenciais gametas, reduzindo o risco de insuficiência ovariana prematura em pacientes (VON WOLFF et al., 2018; FELICE et al., 2018; AKASHA; WOODRUFF, 2019; SONIGO et al., 2019; BUS et al., 2019). No entanto, esses métodos podem ser difíceis de executar e o uso futuro de células germinativas criopreservadas permanece incerto, pois a reinserção de células criopreservadas em pacientes já curados do câncer, pode ocasionar a recidiva do mesmo. Por isso, o cultivo *in vitro* apresenta certa vantagem sobre a criopreservação. Desta maneira, diferentes sistemas de cultivo *in vitro* para folículos pré-antrais estão em desenvolvimento e espera-se que estejam disponíveis e totalmente otimizados para utilização em um futuro próximo (VON WOLFF et al., 2018; SONIGO et al., 2019; BUS et al., 2019).

Até o momento, os melhores resultados obtidos através do cultivo folicular *in vitro*, foram relatados em camundongos com a produção de descendentes vivos a partir de folículos primordiais cultivados *in vitro* (EPPIG; SCHROEDER, 1989). Recentemente, foi demonstrado que após o cultivo *in vitro* de folículos antrais iniciais caprinos, foi possível a produção de embriões e subsequente transferência dos mesmos, alcançando a gestação (SÁ et al., 2020). Já os nascidos vivos, foram obtidos após o cultivo *in vitro* de folículos antrais iniciais bovinos (HIRAO et al., 2004; YAMAMOTO et al., 1999). Entretanto, em outras

espécies de ruminantes, esses resultados têm se limitado à produção de um número variável de oócitos maduros e baixas porcentagens de embriões após o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais secundários isolados de caprinos, búfalos e ovelhas (FIGUEIREDO et al., 2019).

Além disso, o cultivo de tecido ovariano utilizando animais domésticos como modelos, por exemplo, ovelhas e cabras, tem sido utilizado para avaliar os efeitos de diferentes agentes citotóxicos na função ovariana, inclusive um potencial novo fármaco anticâncer (GUERREIRO et al., 2016, 2019, quinoxalina: 2020), além de estudar potenciais moléculas que reduzem o impacto negativo da quimioterapia nos ovários (SONIGO et al., 2019; niacina: WANG et al., 2018b).

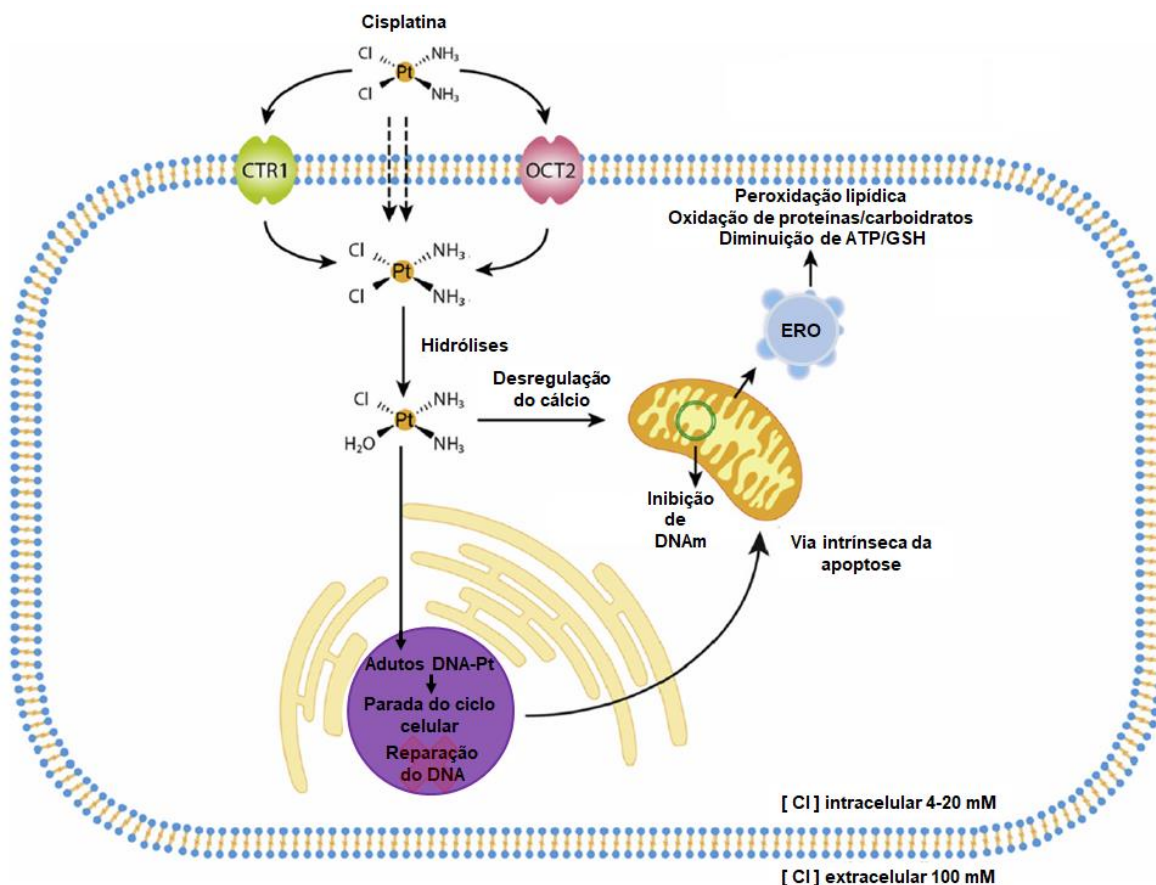
Dentre os principais antineoplásicos, destacam-se os agentes alquilantes (ciclofosfamida e ifosfamida), taxanos (paclitaxel), antraciclinas (doxorubicina), antimetabólitos (gemcitabina e 5-fluorouracil) e compostos de platina (cisplatina e carboplatina) (CHAN; WANG, 2017; FELICE et al., 2018). A cisplatina e a doxorubicina destacam-se entre os mais utilizados e são classificadas como de risco intermediário para a infertilidade, com cerca de 40 a 60% de gonadotoxicidade comprovada (CHANG et al., 2015; ALGARROBA; SANFILIPPO; VALLI-PULASKI, 2018).

## 2.8. Cisplatina

A cisplatina ou cis-diaminodicloridoplatina (II) é uma das drogas antineoplásicas mais comuns e amplamente utilizadas no tratamento de diversos tumores sólidos de cabeça, pescoço, mama, pulmão, estômago, vesícula urinária, próstata e ovário (CAO et al., 2019; GHOSH, 2019a; JIN et al., 2019b; LI et al., 2019a; ZHOU et al., 2019). É um antineoplásico à base de metal, caracterizado por uma configuração plana com um átomo central de platina ligado a dois cloretos e duas amônias na conformação cis (GHOSH, 2019a). A difusão passiva tem sido descrita como a principal via para a cisplatina entrar na célula, uma vez que sua captação é dependente da concentração e não sofre saturação. No entanto, a participação do transporte ativo mediado por proteínas da membrana, como a proteína transportadora de cobre e proteínas transportadoras de cátions orgânicos, também servem como vias de entrada da cisplatina nas células (GATELY; HOWELL, 1993; CIARIMBOLI, 2014; DILRUBA; KALAYDA, 2016).

Uma vez que a cisplatina entra na célula, seus átomos de cloreto são deslocados pelas moléculas de água, e o produto hidrolisado é capaz de reagir com os grupos sulfidril nas proteínas e átomos doadores de nitrogênio nos ácidos nucleicos. A cisplatina se conecta ao DNA nuclear em bases de purinas, provocando alterações químicas, dentre elas, a formação dos adutos de purinas (DNA-platina). Os adutos de DNA-platina bloqueiam a replicação, a transcrição e outras funções nucleares do DNA e ativam as vias de transdução de sinal, que resultam em inibição do crescimento, apoptose e necrose nas células tumorais. A cisplatina também interrompe a homeostase do cálcio, aumentando o efluxo de cálcio das mitocôndrias, ao se ligar ao DNA mitocondrial e desregula a produção de ERO, causando peroxidação lipídica e oxidação de outras moléculas, como proteínas e carboidratos e diminuição de GSH. Além disso, interrompe a respiração celular ocasionando a diminuição da produção de ATP e outros cofatores por inibição enzimática (Figura 12) (DASARI; BERNARD TCHOUNWOU, 2014; GHOSH, 2019a; QUINTANILHA et al., 2019).

**Figura 12.** Principais mecanismos moleculares da citotoxicidade induzida pela cisplatina. Pt: platina. CTR1: proteína transportadora de cobre; DNAm: DNA mitocondrial; DNA-Pt: DNA-platina (cisplatina); ERO: espécies reativas de oxigênio; OCT2: proteínas transportadoras de cátions orgânicos 2. (Adaptado de QUINTANILHA *et al.*, 2019).



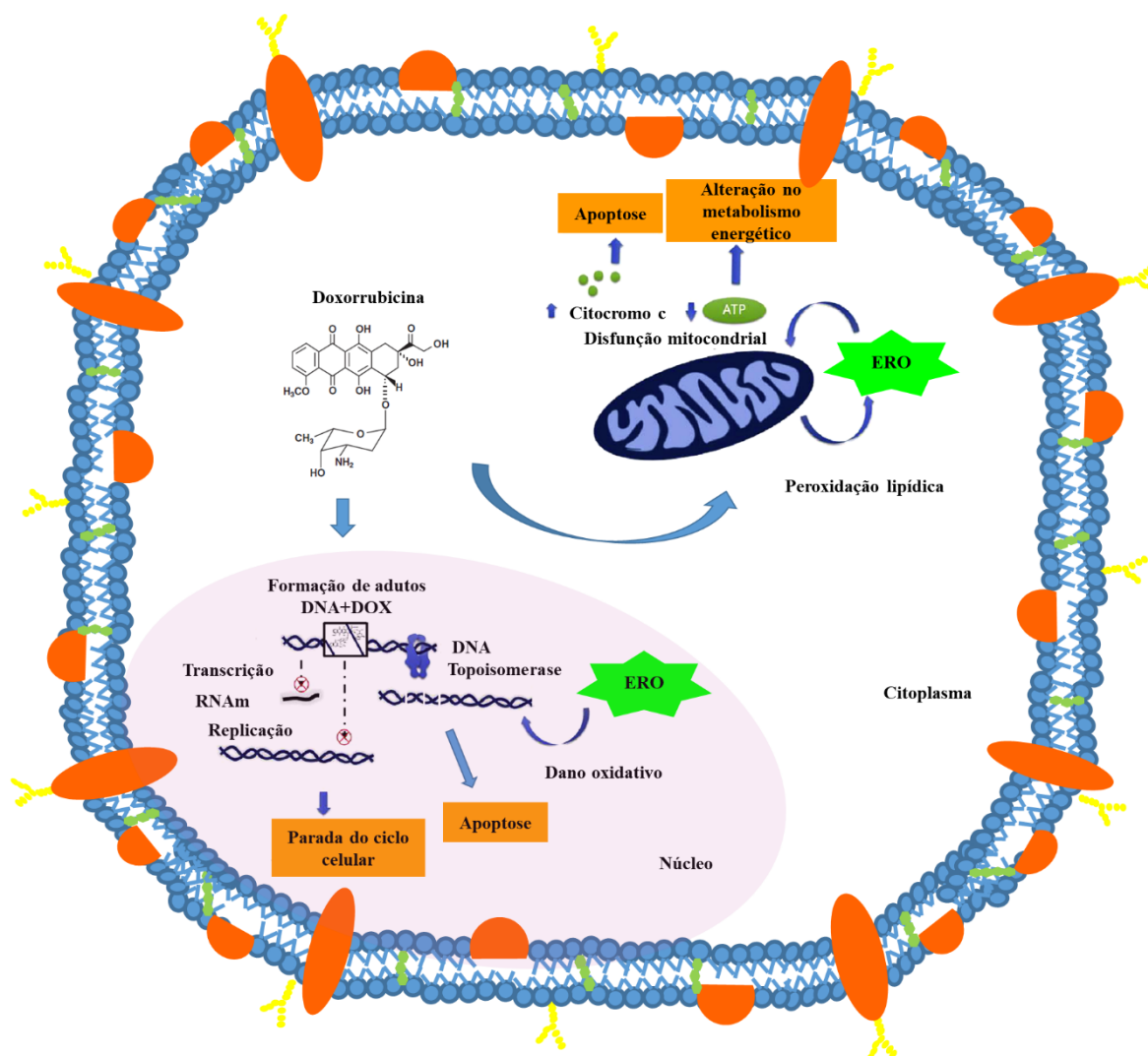
## 2.9. Doxorrubicina

A doxorrubicina está entre os antineoplásicos mais utilizados porque é altamente eficaz no tratamento de várias doenças malignas hematológicas e tumores sólidos (PUGAZHENDHI *et al.*, 2018; VAN DER ZANDEN; QIAO; NEEFJES, 2020). É uma antraciclina não seletiva de classe I que possui duas porções diferenciadas, uma aglicônica que consiste em um anel tetracíclico com grupos adjacentes quinino-hidroquinona, e uma cadeia lateral curta metoxilo seguida pelo grupo carbonil. O segundo, conhecido como daunosamina, compreende uma porção 3-amino-2,3,4-trideoxi-L-fucosil, que está ligada a um dos anéis por uma ligação glicosídica (HILMER *et al.*, 2004).

A doxorrubicina é capaz de se difundir através da membrana mitocondrial e se acumular dentro dela, em seguida libera elétrons, produzindo ERO e perturbando a

integridade funcional da cadeia respiratória, resultando em disfunção mitocondrial por diminuição de ATP e aumento de citocromo c, ocasionando o aumento da apoptose e alterações no metabolismo energético (CHEN et al., 2007; NAJAFI et al., 2020). Além disso, ao se ligar ao DNA, formando adutos, promove a parada do ciclo celular ao mesmo tempo em que induz a quebra de fitas dupla de DNA, ao neutralizar a função da topoisomerase II, e em consequência, aumenta a apoptose (Figura 13) (SZYMANSKA; TAN; OKTAY, 2020; ZANDEN; QIAO; NEEFJES, 2020; VARELA-LÓPEZ et al., 2019). Em adição, a doxorrubicina também atua aumentando a inflamação e a autofagia e interfere na homeostase do cálcio (VARELA-LÓPEZ et al., 2019).

**Figura 13.** Principais mecanismos moleculares da citotoxicidade induzida pela doxorubicina. ATP: adenosina trifosfato; DNA: ácido desoxirribonucleico; DOX: doxorubicina; ERO: espécies reativas de oxigênio; RNAm: RNA mensageiro. (Modificado de VARELA-LÓPEZ et al., 2019).



Vale ressaltar que o tratamento com cisplatina e doxorubicina exibe reações adversas graves, incluindo ototoxicidade, toxicidade renal, embrionária e ovariana (BARBERINO et al., 2017; WANG et al., 2019; ZHOU et al., 2019). Por isso, a gonadotoxicidade feminina causada por esses antineoplásicos vem sendo bastante pesquisada.

## 2.10. Gonadotoxicidade causada pela cisplatina e doxorrubicina

As últimas décadas forneceram evidências crescentes de que os efeitos dos antineoplásicos compromete seriamente o funcionamento normal de células não-cancerosas (MIKUŁA-PIETRASIK *et al.*, 2019), em especial, as células germinativas. Mulheres em idade reprodutiva tratadas com cisplatina ou doxorrubicina podem se sujeitar à perda de folículos primordiais, resultando na depleção da reserva ovariana e consequente insuficiência ovariana prematura (ALGARROBA; SANFILIPPO; VALLI-PULASKI, 2018b; ZHOU *et al.*, 2019). A infertilidade feminina é devido à extrema sensibilidade do DNA dos oócitos da reserva ovariana aos efeitos deletérios da quimioterapia (ROSSI *et al.*, 2017). Os efeitos tóxicos da cisplatina e doxorrubicina no ovário estão associados à lesão de DNA, aumento dos níveis de ERO e danos às mitocôndrias que, finalmente, levam à lesão oxidativa ovariana e apoptose folicular (SOYMAN *et al.*, 2018; GHOSH, 2019a; ZHOU *et al.*, 2019; NAJAFI *et al.*, 2020; ZANDEN; QIAO; NEEFJES, 2020).

Um estudo demonstrou que camundongos que receberam transplantes de tecido ovariano humano e em seguida receberam uma única injeção intraperitoneal de cisplatina (5 mg/kg), apresentaram folículos morfológicamente anormais (com ausência de oócitos), atresia folicular e apoptose de células da granulosa e de oócitos (BILDIK *et al.*, 2018). Além disso, outro estudo demonstrou que uma dose única de cisplatina (7 mg/kg) promove estresse oxidativo ao diminuir enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPX), provocar desequilíbrio dos hormônios sexuais (FSH e E<sub>2</sub>), aumentar marcadores inflamatórios (fator nuclear kappa B), TNF- $\alpha$ , ciclooxigenase-2 [COX-2] e óxido nítrico sintase induzível [iNOS]) e a apoptose (caspase-3) nos tecidos ovariano e uterino de ratas (KAYGUSUZOGLU *et al.*, 2018). Um estudo realizado por Barberino *et al.* (2017), usando a mesma dose com maior tempo de administração (5 mg/kg por 3 dias; total de 15 mg/kg de cisplatina), demonstrou que a cisplatina reduziu a sobrevivência folicular, os níveis de GSH e a proliferação celular e aumentou a apoptose, os níveis de ERO e o dano mitocondrial em ovários de camundongos. Além disso, dados publicados por Kalich-Philosoph *et al.* (2013) mostram que a cisplatina, em associação com a ciclofosfamida, promove a ativação excessiva dos folículos primordiais, resultando no aumento precoce da quantidade de folículos em crescimento (hiperativação de folículos primordiais) e na morte destes folículos por apoptose, perdendo, assim, a reserva folicular ovariana.

Em relação à doxorubicina, estudos recentes mostraram que o tecido ovariano criopreservado de mulheres jovens submetidas à quimioterapia com este antineoplásico, apresentou um grande número de folículos atrésicos e após o cultivo *in vitro* desse mesmo tecido, observou-se uma diminuição na produção de estradiol e progesterona (PAMPANINI et al., 2019). Após o cultivo de folículos secundários de camundongos em diferentes concentrações de doxorubicina (20 e 200 nM) por 24 h, a concentração mais alta (200 nM) induziu dano ao DNA e apoptose folicular e oocitária, bem como a diminuição de estradiol, e a concentração mais baixa (20 nM) aumentou anormalidades na morfologia do fuso meiótico e desalinhamento cromossômico (XIAO et al., 2017). Além disso, a administração de uma dose única de doxorubicina (10 mg/kg) em camundongos interferiu na maturação meiótica (XIAO et al., 2017) e aumentou a apoptose, principalmente, em células da granulosa de folículos em crescimento e oócitos de folículos primordiais (WANG et al., 2019).

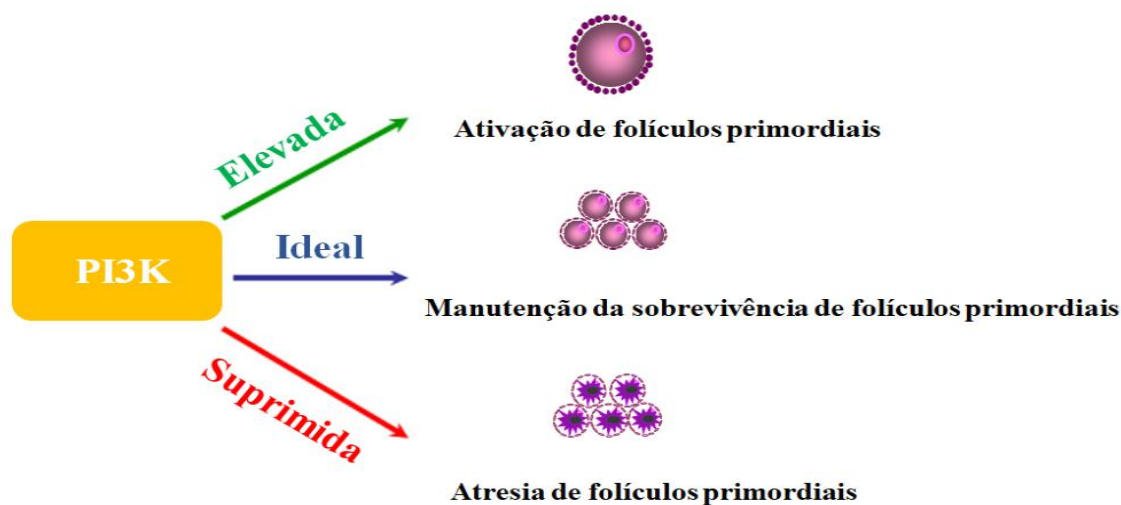
Com a finalidade de entender melhor o mecanismo molecular pelo qual a cisplatina e a doxorubicina atuam, alguns pesquisadores afirmaram que a perda folicular induzida por esses antineoplásicos é mediada por membros da via PI3K, como a proteína quinase B (AKT), a fosfatase e homólogo de tensina (PTEN) e o Forkhead box O3 (FOXO3a) (CHANG et al., 2015; JANG et al., 2016; WANG et al., 2019).

### **2.11. Relação entre a via fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e os folículos ovarianos**

Os processos fundamentais para garantir o sucesso reprodutivo como a manutenção da integridade genômica folicular, ativação e crescimento de folículos primordiais, crescimento, sobrevivência e metabolismo folicular em todos os estádios de desenvolvimento têm influência direta da via PTEN/PI3K/AKT/FOXO3a (MATSUDA *et al.*, 2012; ZHENG *et al.*, 2012; MAIDARTI; ANDERSON; TELFER, 2020). A sinalização da via PI3K intra-oocitária pode influenciar os folículos ovarianos de três formas distintas: a) PI3K elevada: promove ativação folicular e crescimento do oócito; b) PI3K ideal: mantém a sobrevivência de folículos primordiais durante seu período de dormência; c) PI3K suprimida: ocasiona a perda da reserva folicular pela morte dos oócitos (Figura 14) (ZHENG *et al.*, 2012).

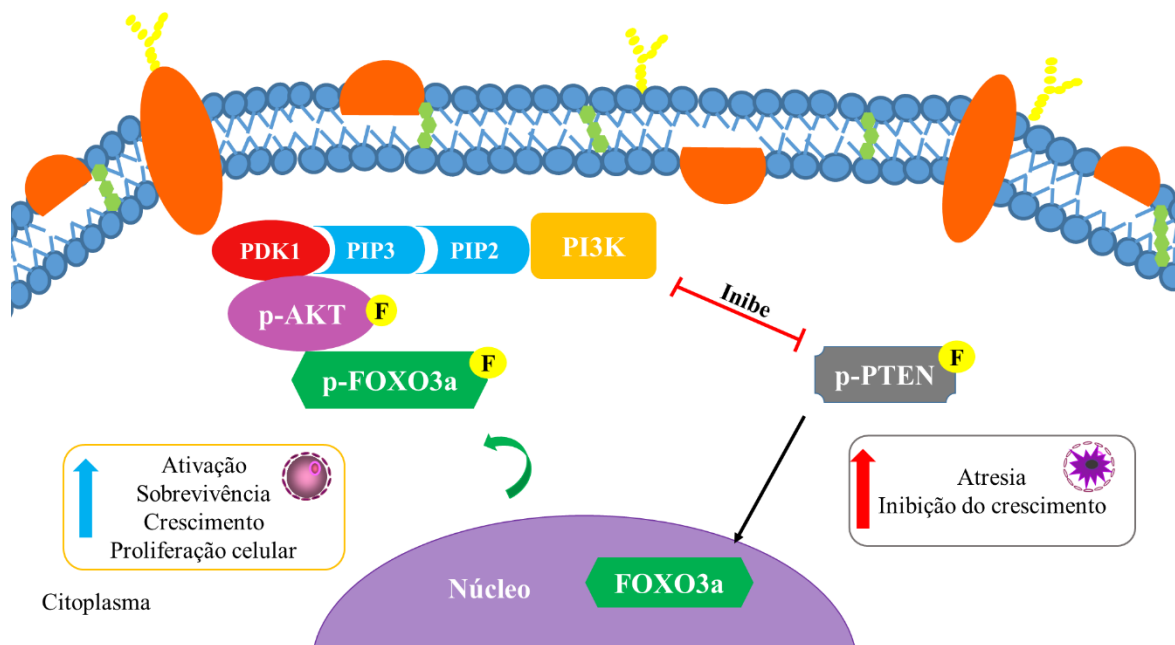


**Figura 14.** Sinalização da via PI3K intra-ocitária no controle da ativação, sobrevivência e atresia de folículos primordiais. (Modificado de ZHENG *et al.*, 2012).



A ligação de fatores de crescimento a receptores de tirosina quinase, presentes na membrana da célula, inicia uma cascata de sinalização intracelular que começa com a ativação da molécula PI3K, que catalisa a fosforilação do fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) e o converte em fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (PIP3), que serve como segundo mensageiro para ativação da quinase-1 dependente de PI3K (PDK1). A PDK1 fosforila e ativa a AKT, que é essencial para a sobrevivência, crescimento e proliferação celular ao inibir proteínas pró-apoptóticas (BAX, BAD, forkhead e p53) e ativar proteínas anti-apoptóticas, como a bcl-2. A PTEN antagoniza a atividade da PI3K por desfosforilação de PIP3 a PIP2, portanto, a PTEN inibe indiretamente a fosforilação e/ou ativação de AKT (MALEK *et al.*, 2017; PULIDO, 2018). A ativação de AKT, conseqüentemente, desencadeia a fosforilação e/ou inativação do FOXO3a, promovendo a translocação de FOXO3a fosforilada do núcleo para o citoplasma (MAKKER; GOEL; MAHDI, 2014). Adicionalmente, condições de estresse, como altos níveis de ROS e/ou alta atividade de PTEN, causam translocação nuclear e ativação do FOXO3a (Figura 15) (IYER *et al.*, 2013; KIM; KOH, 2017; TAUBER; STEINBRENNER; KLOTZ, 2020).

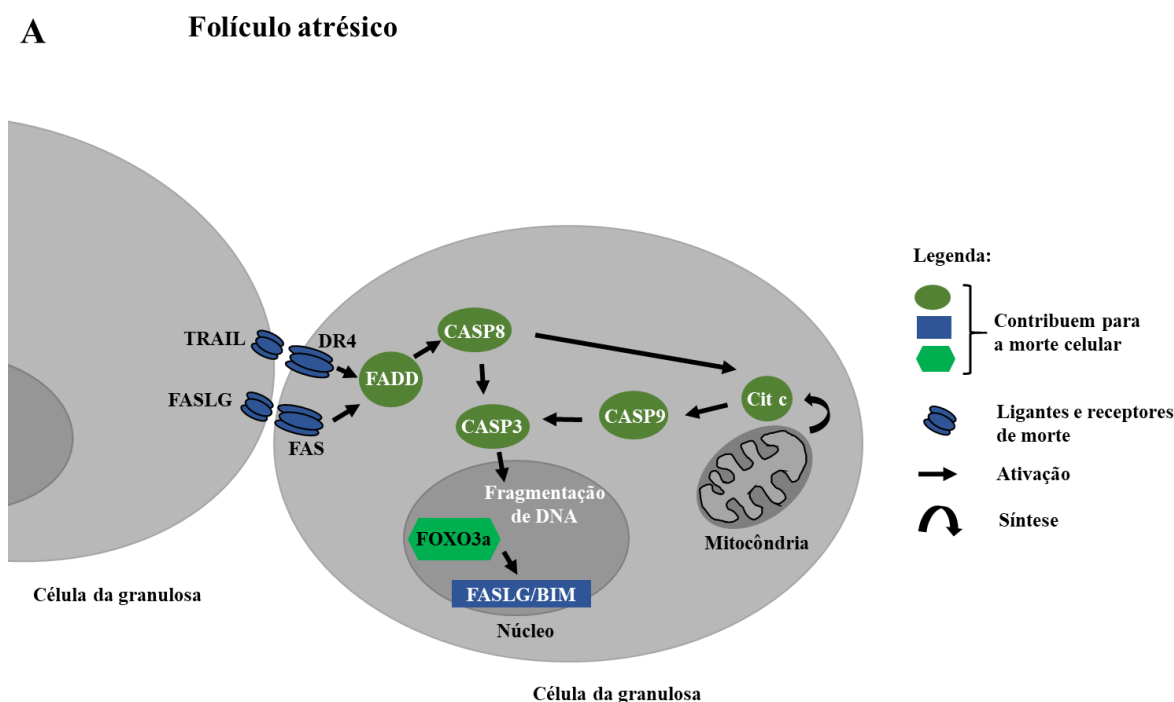
**Figura 15.** Ativação da via PI3K e da FOXO3a e suas respectivas funções e inibições. p-AKT: proteína quinase B fosforilada; PDK1: ; p-FOXO3a: fator de transcrição Forkhead BOX O3a fosforilado; PIP2: fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato; PIP3: fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato; PI3K: fosfatidilinositol-3-quinase; p-PTEN: fosfatase e homólogo de tensina fosforilada. Fonte: Arquivo pessoal.

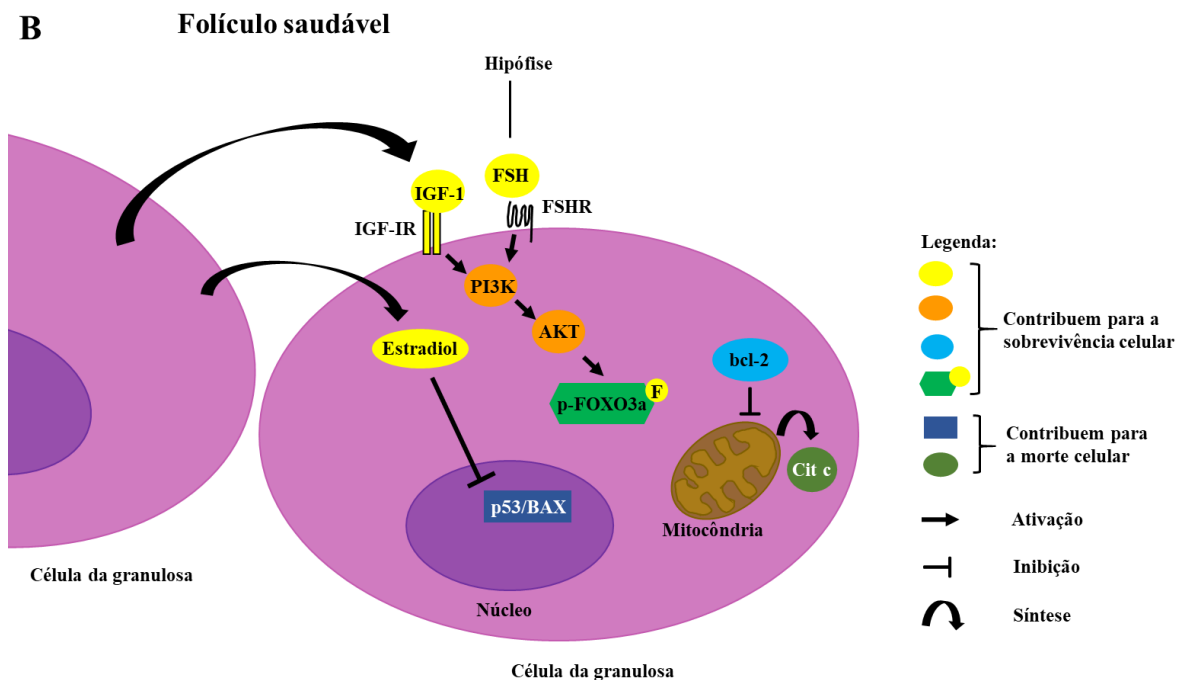


O FOXO3a é expresso em folículos ovarianos e induz apoptose em células da granulosa, tornando-se um iniciador da atresia folicular (LIU et al., 2009a; MATSUDA et al., 2011). O FOXO3a promove a sinalização inibidora do crescimento celular e apoptose, induzindo a expressão de múltiplos membros pró-apoptóticos da família bcl-2 de proteínas direcionadas às mitocôndrias e estimulando a expressão de ligantes e receptores da morte (FASLG-FAS e TRAIL-DR4). Em folículos atresícos, o FOXO3a é desfosforilado e transferido para o núcleo, onde ativa fatores pró-apoptóticos como FASLG e proteína 11 semelhante ao bcl-2 (bcl2L11), comumente chamada de BIM, desencadeando a ativação subsequente da sinalização intracelular da proteína associada ao FAS com domínio da morte (FADD) e caspases-8 e 3 (CASP8 e CASP3), induzindo a fragmentação do DNA. A caspase-8 também estimula a via apoptótica mitocondrial, induzindo a liberação de citocromo c (Cit-c) (Figura 16A). Todavia, quando não está acontecendo a atuação dos fatores pró-apoptóticos, é a vez de outras substâncias ganharem relevância, como os fatores de sobrevivência celular, representados pelo FSH (secretado pela hipófise), fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-I) e estradiol (secretados pelas células da

granulosa de maneira parácrina/autócrina), dentre outros, que são essenciais para manter os folículos saudáveis. O estradiol inibe a transcrição de genes pró-apoptóticos (p53 e BAX), enquanto o FSH e IGF-I ativam a via PI3K/AKT e fosforilam o FOXO3a, retendo-o no citoplasma. Um outro fator de sobrevivência é a bcl-2 que inibe a apoptose pela via intrínseca (Figura 16B) (LIU et al., 2009a; MATSUDA et al., 2011, 2012).

**Figura 16.** Atresia folicular iniciada nas células da granulosa de folículos em crescimento, regulada pela via PI3K/AKT/FOXO3a, caspases-3, 8, 9 e bcl-2. Folículo atrésico (A) e folículo saudável (B). AKT: proteína quinase B; BAX: proteína pró-apoptótica semelhante ao BCL-2 sem o domínio BH4; BIM: proteína 11 semelhante ao BCL-2; Bcl-2: proteína do linfoma de células B-2; CASP: caspase; Cít c: citocromo c; DR4: receptor de morte específico do TRAIL; FADD: proteína associada ao FAS com domínio da morte; FAS: receptor de morte específico do FASL; FASLG: ligante de morte FASL; FOXO3a: fator de transcrição Forkhead BOX O3a; FSH: hormônio folículo estimulante; FSHR: receptor do FSH; IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina-1; IGF1-R: receptor do IGF-1; PI3K: fosfatidilinositol-3-quinase; P53: proteína pró-apoptótica. (Modificado de MATSUDA *et al.*, 2012).





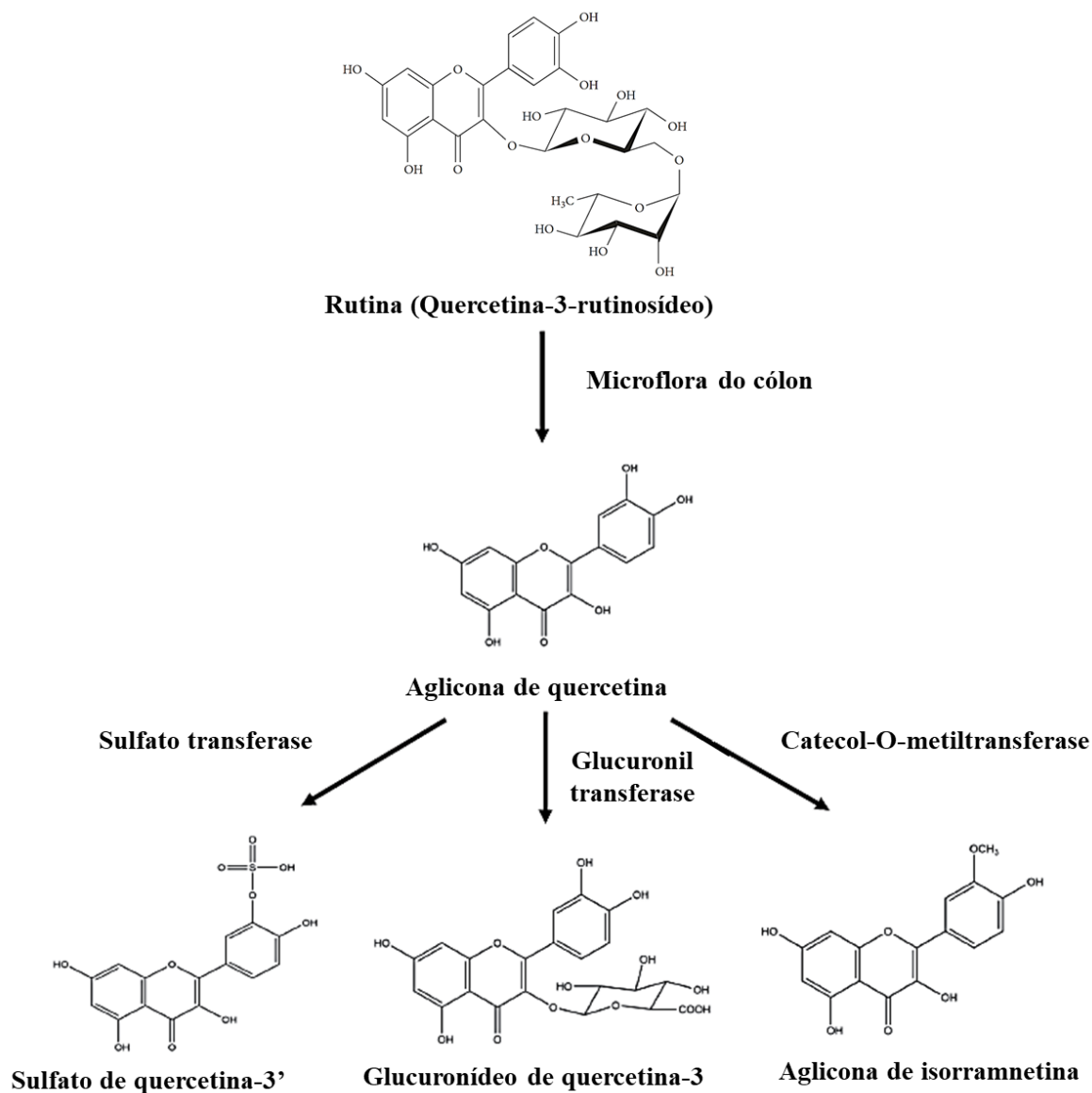
Além de atuar na sobrevivência, a PI3K controla a ativação de folículos primordiais através do FOXO3a. O FOXO3a é importado para o núcleo durante a montagem do folículo primordial e exportado, na forma fosforilada, desencadeando a ativação (JOHN *et al.*, 2008). Estudos *in vitro* mostraram que a baixa qualidade de embriões em bovinos está relacionada a maiores níveis de RNAm para PTEN em células da granulosa murais e do cúmulus (ANDRADE *et al.*, 2017) e que a ativação da PI3K/AKT aumenta a maturação de oócitos, melhorando o desenvolvimento embrionário em suínos (SONG *et al.*, 2018).

Existe um grande interesse em caracterizar os mecanismos envolvidos no dano ovariano causado pela quimioterapia, pois isso pode levar à identificação de substâncias potencialmente protetoras, com possíveis terapêuticas futuras. As pesquisas nesse campo ainda estão em estágio experimental e são necessárias mais investigações para desenvolver tratamentos efetivos e individualizados para aplicação clínica, bem como o conhecimento sobre possíveis co-tratamentos que possam proteger o ovário e os folículos de tais danos (HAO *et al.*, 2019). Considerando que a cisplatina e doxorrubicina causam estresse oxidativo e que podem agir pela via PI3K, o uso de antioxidantes que também possam atuar por essa via, pode se tornar uma opção para diminuir os efeitos adversos desses antineoplásicos. Dentre os antioxidantes, podemos destacar a rutina.

### 2.11. Rutina

A rutina (3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona-3-ramnoglicosídeo) é um flavonoide da subclasse flavonol, também conhecida como vitamina P, quercetina-3-O-rutinosídeo ou soforina. Ela é um glicosídeo (rutinose) do flavonoide quercetina (VÁZQUEZ-FLORES et al., 2017), sendo encontrada em frutas, legumes ou em plantas medicinais (ATANASSOVA; BAGDASSARIAN, 2009; FENG et al., 2015). Estudos demonstram que após a sua administração por via oral, a rutina não é absorvida em sua forma original, pois não é detectada no plasma, porque é completa e rapidamente metabolizada em aglicona de quercetina na parte distal do intestino ou cólon pela sua microflora e, em seguida, metabolizada em seus conjugados: sulfato e glucuronídeo de quercetina e aglicona de isorramnetina pelas enzimas sulfato transferase, glucuronil transferase e catecol-O-metiltransferase, respectivamente (Figura 17) (MANACH et al., 1997; SITI et al., 2020). Portanto, os conjugados de quercetina estão sendo usados como marcadores de absorção e biodisponibilidade da rutina, pois a suplementação da mesma aumenta os níveis plasmáticos deles, quatro horas após a ingestão de rutina (BOYLE et al., 2000; YANG et al., 2005), sendo que a meia-vida da quercetina derivada da rutina é de 28 horas (ERLUND et al., 2000).

**Figura 17.** Ilustração da estrutura química da rutina original (quercetina-3-O-rutinosídeo) e seus metabólitos: aglicona, sulfato e glucuronídeo de quercetina e aglicona de isorramnetina (Adaptado de SITI et al., 2020).

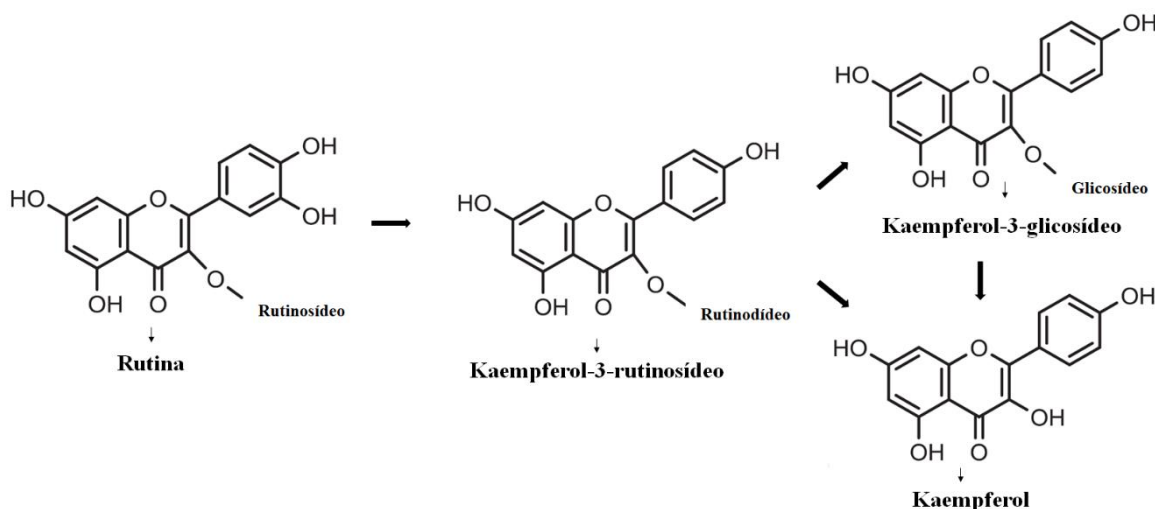


Do ponto de vista tecnológico, a rutina ganha vantagem em relação à quercetina por proporcionar uma maior praticidade nas suas preparações, devido a sua solubilidade em água ser maior do que a da quercetina. Essa maior solubilidade da rutina deve-se à hidrofiliabilidade da fração de açúcar (ramnoglicósido) presente na sua molécula (LAURO et al., 2002). Além disso, o encapsulamento da rutina em lipossomas (sistema de entrega de drogas) protegeu fibroblastos de camundongos após exposição ao peróxido de hidrogênio, enquanto

o encapsulamento da quercetina não proporcionou efeito na melhora da viabilidade celular (BONECHI et al., 2018).

Adicionalmente, a rutina também pode ser biotransformada em outros compostos. Segundo Lin et al., (2014), após a fermentação, a rutina é desidroxilada, formando kaempferol-3-rutinosídeo e, em seguida, desglicosilada, formando kaempferol-3-glicosídeo e kaempferol (Figura 18). Da mesma forma, após suplementação de rutina (500 mg/kg) por 6 semanas em dezoito mulheres saudáveis, não houve quaisquer alterações adversas nas células sanguíneas ou na função hepática, e sim, um aumento nos níveis plasmáticos de quercetina, kaempferol e isorhamnetina (BOYLE et al., 2000). Essas biotransformações da rutina podem ser importantes, pois ela sozinha pode proporcionar efeitos benéficos de três antioxidantes. Apesar da absorção da rutina no plasma ser através de seus metabólitos, ela pode ser absorvida na sua forma original em outro local, pois, estudos demonstraram a presença de rutina no tecido linfático de ratos, após administração intraduodenal de 300 mg/kg de rutina, indicando o transporte desse antioxidante para a linfa a partir do intestino delgado (CHEN et al., 2010).

**Figura 18.** Ilustração da biotransformação da rutina em outras estruturas químicas: kaempferol-3-rutinosídeo, kaempferol-3-glicosídeo e kaempferol (Adaptado de LIN et al., 2014).



A rutina tem recebido grande atenção na literatura, devido às suas propriedades farmacológicas, incluindo antimicrobiana, anti-inflamatória, anticancerígena, antidiabética,

neuroprotetora, nefroprotetora, hepatoprotetora, cardioprotetora e antioxidante. Atualmente, mais de 860 produtos que contêm rutina são comercializados nos Estados Unidos da América (GHORBANI, 2017; GULLÓN et al., 2017; TOPAL et al., 2018). Ela pode prevenir danos celulares através dos seguintes mecanismos: neutralização direta e indireta de ERO; ativação de enzimas antioxidantes e de antioxidantes de baixo peso molecular (não-oxidantes) como as vitaminas A, C e E; quelação de metais (sequestro de íons metálicos nocivos); inibição de oxidases; redução do estresse oxidativo causado pelo óxido nítrico; prevenção da peroxidação lipídica e danos ao DNA mitocondrial (PROCHÁZKOVÁ; BOUŠOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011; SEO et al., 2015; YASHAVARDDHAN et al., 2017; CAI et al., 2019; MUHAMMAD et al., 2019; SINGH et al., 2019b).

Na área da reprodução, a rutina exerceu sua ação protetora sobre danos induzidos por peroxidação lipídica em espermatozoides humanos (MORETTI et al., 2012) e de veados galheiros (MATA-CAMPUZANO et al., 2012). A rutina também protegeu o tecido testicular contra o estresse oxidativo observado no diabetes mellitus tipo 1 e estresse oxidativo induzido por isquemia e reperfusão em ratos (AKONDI; CHALLA; AKULA, 2011; AKONDI et al., 2011). Além disso, a rutina é eficiente na supressão do estresse oxidativo *in vitro*, induzido pelo colesterol, em células ovarianas de hamster (AHERNE; O'BRIEN, 1999). Nossa equipe demonstrou que a rutina manteve a viabilidade e aumentou os níveis de GSH em folículos secundários ovinos cultivados *in vitro* (LINS et al., 2017).

Quando associada à quimioterapia, a rutina pode aumentar o efeito anticâncer de antineoplásicos como a temozolomida e 5-fluorouracil em células de glioblastoma multiforme e na linhagem de células do câncer de próstata, respectivamente (ZHANG et al., 2017; SATARI et al., 2019). Desta forma, as substâncias antioxidantes, como a rutina, também apresentam potencial tóxico ou pró-oxidante e antineoplásico dependendo da dose administrada às células e do tipo de célula, e seus efeitos anticâncer podem ser mediados pela supressão da proliferação celular, indução de apoptose ou autofagia e inibição da angiogênese e metástase (FARHA et al., 2020; PROCHÁZKOVÁ; BOUŠOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011). Estudos demonstraram que altas concentrações de rutina inibem a proliferação celular e induzem apoptose após cultivo *in vitro* de diferentes células cancerosas humanas (leucemia: 9,6 µg; mama: 19,4 µg; pâncreas: 26 µg e colo do útero: 30 µg/mL de rutina) (CALZADA et al., 2018; DEEPIKA et al., 2019; SALEH et al., 2019). Por outro lado, a combinação de rutina com cisplatina auxilia na morte de células de linfoma de Dalton, exercendo uma função adicional de reduzir os efeitos adversos deste antineoplásico em

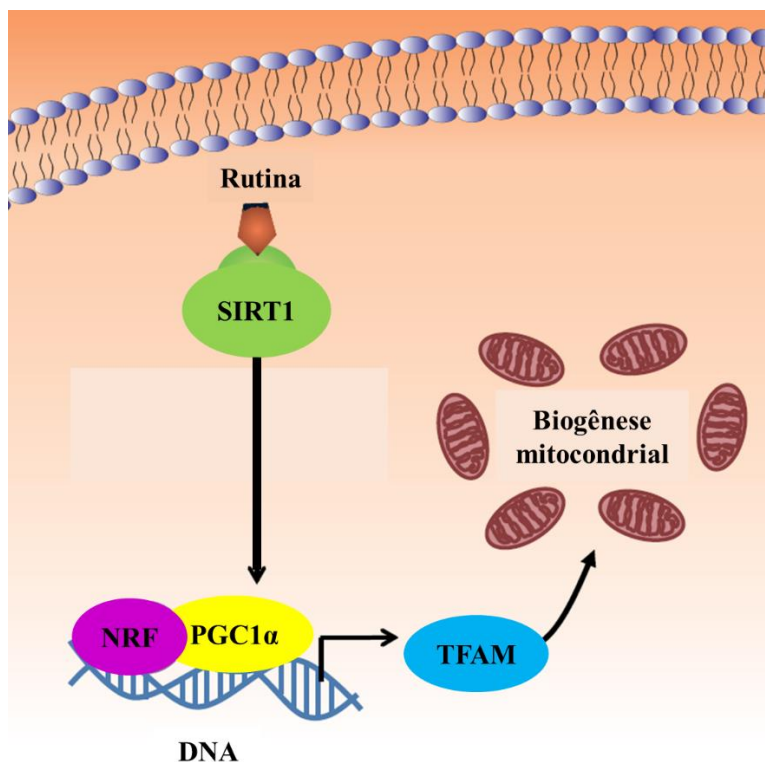


células sanguíneas de camundongos (PRASAD; PRASAD, 2018). Também foi relatado que o uso de rutina durante a quimioterapia previne a toxicidade induzida por cisplatina em neurônios, na retina e no nervo óptico e coração (ALMUTAIRI et al., 2017; TAŞLI et al., 2018; TOPAL et al., 2018). A rutina tem sido estudada na prevenção da fertilidade masculina, uma vez que o pré-tratamento com rutina protegeu células testiculares contra a toxicidade induzida pela cisplatina e ciclofosfamida em ratos (ABARIKWU et al., 2012; AKSU et al., 2017).

Estudos têm mostrado que a rutina regula a via de sinalização PI3K e seus membros AKT, PTEN e FOXO3a (BOUROGAA et al., 2011; LV et al., 2018; FEI et al., 2019; LI et al., 2019b). A rutina aumenta a fosforilação de AKT (HUANG et al., 2017; MA et al., 2017), o que foi associado a uma redução das proteínas associada aos microtúbulos 3 (LC3), gene 5 relacionado à autofagia (ATG5) e de ligação à ubiquitina ou sequestossomo-1 (P62 ou SQSTM1) (MA et al., 2017). ATG5 e LC3 aumentam a formação de autofagossomo (LI et al., 2016), enquanto P62 aumenta a autofagia (MANS et al., 2017). Portanto, a rutina pode ser capaz de equilibrar a resposta autofágica, o que também pode ser a possível explicação de como a rutina pode reduzir a necrose (SITI et al., 2020). Além disso, a rutina reduz a apoptose ao suprimir a caspase-3 e Bax associada a um aumento de bcl-2 (MA et al., 2017; WANG et al., 2018a).

Por outro lado, pesquisas recentes demonstraram que a rutina aumenta a sirtuína 1 ou regulador de informação silenciosa 1 (SIRT1), que então ativa seus efetores, proteína coativadora-1 $\alpha$  do receptor  $\gamma$  ativada por proliferador de peroxissoma (PGC1- $\alpha$ ), fator respiratório nuclear (NRF) e fator de transcrição mitocondrial A (TFAM), promovendo a biogênese mitocondrial (Figura 19) (SEO et al., 2015; YUAN et al., 2017; RAJAGOPALAN; CHANDRASEKARAN; CARANI VENKATRAMAN, 2017; LIN et al., 2018; YANG et al., 2019), o que pode estar envolvido na sobrevivência celular (CHAN et al., 2017). Por fim, pode-se observar que a rutina é um potente antioxidante que exerce inúmeras funções de proteção celular (GANESHPURKAR; SALUJA, 2017).

**Figura 19.** Mecanismo molecular pelo qual a rutina estimula a biogênese mitocondrial. NRF: fator respiratório nuclear; PGC1 $\alpha$ : proteína coativadora-1 $\alpha$  do receptor  $\gamma$  ativada por proliferador de peroxissoma; SIRT1: sirtuína 1; TFAM: fator de transcrição mitocondrial A. (Modificado de YUAN et al., 2017).



A rutina apresentou bons resultados no cultivo de folículos isolados de ovários ovinos. Além disso, ela é comumente comercializada em drogas convencionais como o Venocur Triplex® para tratamento de trombozes, varizes e edemas estáticos, e o Nativit Minerais®, como suplemento vitamínico-mineral, dentre outros. Desta forma, sugere-se que ela tem potencial para ser testada no cultivo *in vitro* de tecido ovariano ovino e como agente terapêutico antes do tratamento antineoplásico, com a intenção de prevenir os danos ovarianos. No entanto, ainda se faz necessário compreender melhor os mecanismos pelos quais ela pode atuar tanto no cultivo de tecido ovariano quanto para impedir a toxicidade ovariana induzida pela cisplatina ou doxorrubicina.

### 3. JUSTIFICATIVA

O cultivo *in vitro* de tecido ovariano representa uma abordagem importante para aprimorar o entendimento sobre a ativação de folículos primordiais, os mecanismos de ação e as vias de sinalização que agem na foliculogênese inicial, como a via PI3K/AKT. Esta técnica também é útil para avaliar os efeitos de diferentes substâncias citoprotetoras no ovário, com a finalidade de, em um futuro próximo, preservar a reserva ovariana em pacientes submetidas à quimioterapia. Para isso, podem ser realizados experimentos com ovários de animais domésticos, como ovelhas, pois possuem a arquitetura do tecido ovariano semelhante à dos humanos, com uma túnica albugínea bem definida e um estroma cortical denso e rico em colágeno, contendo os folículos primordiais. Além disso, o modelo experimental utilizando animais de laboratório, como os camundongos, é importante, pois possibilita o aperfeiçoamento de biotécnicas reprodutivas, podendo servir de base para outras espécies, desde animais de produção até os humanos.

Sabe-se que a regulação da foliculogênese em folículos pré-antrais é um processo extremamente complexo, que envolve a interação entre diferentes fatores que ativam diferentes vias de sinalização. Por isso, é importante avaliar a influência de substâncias com potencial citoprotetor, como a rutina, no início do desenvolvimento folicular *in vitro*, aprofundando os estudos para decifrar um dos prováveis mecanismos de ação celular em que ela poderia estar atuando para preservar e/ou estimular a ativação e o crescimento folicular.

Além disso, o número de novos casos de câncer em mulheres e crianças tem aumentado a cada ano e o tratamento com antineoplásicos pode resultar em subfertilidade ou infertilidade devido à ação gonadotóxica. Desta forma, a preservação das funções ovarianas antes, durante e/ou após o tratamento antineoplásico, tornou-se uma questão importante. Essa gonadotoxicidade pode estar associada, especialmente, aos agentes alquilantes do DNA, como, por exemplo, a cisplatina, e aos inibidores de topoisomerasas, como a doxorrubicina. A ação da cisplatina e da doxorrubicina pode depender, pelo menos em parte, da produção excessiva de ERO e redução das enzimas antioxidantes, levando ao estresse oxidativo, apoptose folicular, disfunção e esgotamento da reserva ovariana, resultando em falha ovariana prematura. Por causa disso, estratégias de intervenção usando compostos bioativos derivados de plantas, como a rutina, têm sido oferecidas como uma forma de tratamento para essas condições. Diante disso, a possibilidade de utilizar uma substância que já está incluída em drogas comumente comercializadas, poderia sugerir uma

nova indicação terapêutica para este composto no desenvolvimento de um novo fármaco direcionado exclusivamente para o ovário.

A rutina é um flavonóide que pode ser encontrado em abundância em algumas frutas e chás. Ela possui propriedades antioxidantes, através da eliminação de ERO e o aumento da atividade de enzimas antioxidantes, prevenindo o estresse oxidativo e apoptose. Ela manteve a viabilidade de folículos isolados ovinos cultivados *in vitro* e protegeu a fertilidade de ratos contra a quimioterapia com cisplatina. No entanto, apesar do papel antioxidante e citoprotetor da rutina, ainda não há estudos sobre o seu efeito no cultivo de tecido ovariano ovino ou relatando o potencial protetor dessa substância sobre os danos ovarianos induzidos pela cisplatina ou doxorubicina em um modelo animal. Desse modo, a rutina apresenta-se como um suplemento promissor a ser adicionado ao meio de cultivo de células e uma substância alternativa a ser utilizada como agente protetor frente aos efeitos adversos causados pelos agentes antineoplásicos.

#### **4. HIPÓTESES**

Após cultivo *in vitro* de tecido ovariano ovino, a rutina mantém a sobrevivência e promove o desenvolvimento dos folículos primordiais ovinos;

Após tratamento *in vivo*, a rutina protege os folículos ovarianos contra os danos induzidos pela cisplatina e pela doxorrubicina em camundongos, através de seu efeito antioxidante, reduzindo o estresse oxidativo e a apoptose folicular;

A rutina age no ovário através dos membros da via de sinalização PI3K.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo geral

Estudar o efeito da rutina no cultivo *in vitro* de tecido ovariano ovino e na prevenção dos danos ovarianos causados pela cisplatina e doxorubicina em camundongos, e investigar se as proteínas fosforiladas (p-AKT, p-PTEN e p-FOXO3a), que são componentes da via PI3K, estão envolvidas na possível preservação da função ovariana pela rutina nessas espécies.

### 5.2. Objetivos específicos

Analisar os efeitos de diferentes concentrações de rutina na morfologia (sobrevivência), apoptose, ativação do folículo primordial e crescimento folicular após cultivo *in vitro* de tecido ovariano ovino (capítulo 1), analisando os seguintes parâmetros:

- Morfologia folicular (sobrevivência) por histologia clássica;
- Ativação de folículos primordiais por histologia clássica;
- Apoptose folicular através análise da expressão de caspase-3 ativada por imunohistoquímica;
- Possível mecanismo de ação pela proteína da via PI3K (AKT) através da análise da expressão de p-AKT por imunohistoquímica.

Avaliar a influência da rutina sobre a toxicidade da cisplatina (capítulo 2) e da doxorubicina (capítulo 3) em ovários de camundongos, analisando os seguintes parâmetros:

- Morfologia folicular (sobrevivência) por histologia clássica;
- Ativação de folículos primordiais por histologia clássica;
- Proliferação celular através da análise da expressão de PCNA por imunohistoquímica;

- Apoptose folicular através análise da expressão de caspase-3 ativada por imunohistoquímica;
- Níveis de ERO e GSH (estresse oxidativo) e atividade mitocondrial por imunofluorescência;
- Possível mecanismo de ação por proteínas da via PI3K (PTEN e FOXO3a) através análise da expressão de p-PTEN e p-FOXO3a por imunohistoquímica.

**Capítulo I.**

Rutin promotes activation and reduces apoptosis of primordial follicles by regulation of Akt phosphorylation after *in vitro* culture of ovine ovarian tissue

(Rutina promove ativação e reduz apoptose de folículos primordiais pela regulação da fosforilação de Akt após cultivo *in vitro* de tecido ovariano ovino)

T.L.B.G. Lins<sup>1</sup>, R.S. Barberino<sup>1</sup>, A.P.O. Monte<sup>1</sup>, J.G.C. Pinto<sup>1</sup>, D.S.P. Campinho<sup>1</sup>,  
R.C. Palheta Jr.<sup>2</sup>, M.H.T. Matos<sup>1\*</sup>

<sup>A</sup>Nucleus of Biotechnology Applied to Ovarian Follicle Development, Federal University of São Francisco Valley, 56300-990, Petrolina-PE, Brazil

<sup>B</sup>Laboratory of Veterinary Pharmacology, Department of Veterinary Medicine, Federal University of São Francisco Valley, 56300-990, Petrolina-PE, Brazil

**Submetido para publicação no periódico Theriogenology  
(Qualis A1 na área de Biotecnologia; Fator de impacto: 2,09) – Anexo 1**



**Rutin promotes activation and reduces apoptosis of primordial follicles by regulation of Akt phosphorylation after *in vitro* culture of ovine ovarian tissue**

T.L.B.G. Lins<sup>1</sup>, R.S. Barberino<sup>1</sup>, A.P.O. Monte<sup>1</sup>, J.G.C. Pinto<sup>1</sup>, D.S.P. Campinho<sup>1</sup>,  
R.C. Palheta Jr.<sup>2</sup>, M.H.T. Matos<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Nucleus of Biotechnology Applied to Ovarian Follicle Development, Federal University of São Francisco Valley, Petrolina, PE, Brazil; <sup>2</sup>Laboratory of Veterinary Pharmacology, Department of Veterinary Medicine, Federal University of São Francisco Valley, Petrolina, PE, Brazil.

Running head: Rutin and PI3K pathway in ovine preantral follicle

\*Correspondence should be addressed to:

Laboratório de Biologia Celular, Citologia e Histologia

Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF)

Rodovia BR 407, Km 12, Lote 543 - Projeto de Irrigação Nilo Coelho - S/N, C1

CEP: 56300-990 - Petrolina - PE – Brasil.

Corresponding author: [helena.matos@univasf.edu.br](mailto:helena.matos@univasf.edu.br) (M.H.T. Matos)

## Abstract

The aims of this study were to analyze the effects of different concentrations of rutin on the primordial follicle survival and development after *in vitro* culture of sheep ovarian tissue, and to verify the possible involvement of the phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) pathway in the rutin actions. Ovarian fragments were fixed for histological analysis (fresh control) or cultured in  $\alpha$ -minimum essential medium alone ( $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>: control medium) or in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> supplemented with different concentrations of rutin (0.1; 1 or 10  $\mu$ g/mL) for 7 days. Inhibition of the PI3K activity was performed in fragments cultured with 50  $\mu$ M LY294002. Thereafter, immunohistochemistry was performed to evaluate the expression of cleaved caspase-3 (apoptosis) and Akt phosphorylation (p-Akt). The results showed that 1  $\mu$ g/mL rutin has higher percentage of normal follicles ( $P < 0.05$ ) than those of the  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> and other rutin treatments. In addition, 1  $\mu$ g/mL rutin maintained the follicular apoptosis similar ( $P > 0.05$ ) to that of the fresh control and lower than  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> and 10  $\mu$ g/mL rutin. All rutin concentrations increased ( $P < 0.05$ ) the follicular activation compared with the fresh control and  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>. Moreover, follicular and oocyte diameters increased ( $P < 0.05$ ) only after culture with 1  $\mu$ g/mL rutin. After PI3K inhibition, there was a reduction ( $P < 0.05$ ) of rutin follicular effects. In conclusion, 1  $\mu$ g/mL rutin promotes primordial follicle activation and growth and reduces apoptosis of preantral follicles through the PI3K/Akt pathway after *in vitro* culture of sheep ovarian tissue.

**Keywords:** Vitamin P, Flavonoid, Oocyte, Sheep, PI3K pathway

## 1. Introduction

The mammalian ovary is rich in primordial follicles (ovarian reserve) that can act as important sources of fertilizable eggs, but few of them are activated to enter the growing follicle pool [1,2]. Therefore, *in vitro* culture of ovarian tissue represents an outstanding tool to enhance our understanding of the regulatory mechanisms underlying early folliculogenesis by investigating the effects of different hormones, growth factors, and natural products on primordial follicle survival and activation [3,4]. Moreover, it allows the

future use of a large number of oocytes in assisted reproductive technologies in females with a reduced ovarian reserve [3–6].

Unfortunately, it is not entirely clear which factors and mechanisms control the development of primordial follicles [7,8]. Currently, it is known that stimulation of phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway by different factors has been implicated in the regulation of the *in vitro* follicular activation and/or survival (mice:[9]; cat: [10]; sheep: [11–13]). In this context, research conducted by our group has demonstrated that PTEN/FOXO3a, which are members of the PI3K pathway, participates in the mechanism of rutin protective action in the mice ovary [14].

Rutin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone-3-ramnoglucoside) is a flavonoid widely found in plants, teas, and fruits [15,16]. Considering its health benefits due to the anti-inflammatory, anticancer, cytoprotective and antioxidant effects, rutin is a promising substance for pharmaceutical and cosmetic industries [14,17–20]. *In vivo* studies demonstrated that rutin increases the estrogen and estrogen receptor levels, restoring estrous cyclicity and improving the function of the heterotopically transplanted ovarian tissue (mouse: [21]), improves metabolic, biochemical and hormonal disturbances in polycystic ovary syndrome (PCOS) model (rat: [22]), and ameliorates the ischemia-reperfusion-induced ovarian injury via its antioxidant and anti-inflammatory effects (rat: [23]). Moreover, *in vitro* studies have shown that rutin decreases oxidative stress in ovarian cells of Chinese hamster [24], and maintains the viability and increases the GSH levels after culture of ovine secondary follicles [25].

However, the mechanism involved in the effects of rutin on the *in vitro* development of ovine ovarian follicles is not yet known. We hypothesized that rutin would promote ovine primordial follicle activation through the PI3K/Akt pathway. Thus, the aims of this study were to analyze the effects of different concentrations of rutin on the survival, apoptosis, primordial follicle activation and growth after *in vitro* culture of ovarian tissue, and to verify the possible involvement of the PI3K/Akt pathway in the rutin actions in the sheep ovary.

## 2. Materials and methods

Unless noted otherwise, all chemicals used in this study were purchased from Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

### 2.1. Source of ovarian tissue

Ovine ovaries (n = 22) from adult crossbred sheep (n = 11) were collected at a local slaughterhouse and used for the *in vitro* culture with different concentrations of rutin (n = 10 ovaries) or with the PI3K inhibitor (n = 12 ovaries). Immediately postmortem, the ovaries were washed once in 70% alcohol (Dinâmica, São Paulo, Brazil), and twice in minimum essential medium buffered with HEPES (MEM-HEPES) and supplemented with antibiotics (100 µg/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin). Next, the ovaries were transported within 1 h to the laboratory in tubes containing MEM-HEPES and antibiotics at 4°C.

### 2.2. In vitro culture of ovarian tissue

The *in vitro* culture was performed according to Barberino et al. [12]. In the laboratory, each ovarian pair (n = 10 ovaries from 5 sheep) was fragmented into slices of approximately 3 mm x 3 mm x 1 mm in size using a scalpel under sterile conditions. Subsequently, one ovarian fragment from each animal was immediately fixed in 10% buffered formalin (Dinâmica) for classical histology and served as fresh control. The remaining slices of the ovarian cortex were randomly divided into different treatments and cultured individually for 7 days in 1 mL of culture medium in 24-well culture dishes at 39°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. The base culture medium (control) consisted of alpha-modified MEM ( $\alpha$ -MEM; pH 7.2–7.4) supplemented with 10 ng/mL insulin, 5.5 µg/mL transferrin, 5 ng/mL selenium, 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine, 50 µg/mL ascorbic acid and 1.25 mg/mL bovine serum albumin (BSA) and then referred as  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>. To verify the influence of rutin on the *in vitro* culture of sheep ovarian cortex, the slices were divided into  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> (control medium) or  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> supplemented with different concentrations of rutin (0.1, 1 or 10 µg/mL), which were chosen based on a previous study [25]. Media were changed and treatments replenished every two days. Each treatment was repeated five times (five replicates), thus using the ovaries of five different animals.

### 2.3. Morphological analysis and assessment of in vitro follicular growth

Tissues from the fresh control and from all cultured treatments were fixed in 10% buffered formalin (Dinâmica), dehydrated using graded ethanol (Dinâmica), clarified in

xylene (Dinâmica) and embedded in paraffin (Dinâmica). The ovarian cortex was cut into 5 µm thick serial sections, mounted on glass slides and stained with hematoxylin and eosin (Vetec, São Paulo, Brazil) for routine histological examination, under a light microscopy (Nikon, Tokyo, Japan; 400x magnification). The preantral follicles were classified as morphologically normal when an intact oocyte was present and surrounded by granulosa cells that were well organized in one or more layers and had no condensation of nuclear chromatin. Atretic follicles were defined as those with a shrunken or vacuolated oocyte, condensed chromatin, disorganized granulosa cells detached from the basement membrane, and/or cell swelling. Blind follicle counting was performed on every fifth section of the ovaries by one experienced investigator. To avoid double counting of the same follicles, a follicle was counted on the first section in which the centrally located nucleus of the oocyte appeared. Overall, 150 follicles were evaluated for each treatment (30 follicles × five replicates = 150 follicles per treatment), totaling 750 preantral follicles.

For assessment of the follicular activation and growth (oocyte and follicular diameters), only histologically normal follicles with visible oocyte nucleus were recorded. The evaluation of follicular activation (transition from primordial to growing follicles), was performed by quantifying the preantral follicles at different stages of follicular development [26], as primordial (one layer of flattened pregranulosa cells around the oocyte) or growing follicles (intermediate: one layer of flattened and cuboidal granulosa cells; primary: one layer of cuboidal granulosa cells, and secondary: two or more layers of cuboidal granulosa cells around the oocyte and no sign of antrum formation). The proportion of primordial and growing follicles was calculated at day 0 (fresh control) and after 7 days of culture. Additionally, from the basement membrane, the major and minor axes of morphologically normal follicles and oocytes (30 per treatment) were measured using the Image-Pro Plus® software (Media Cybernetics, Warrendale, PA, USA). The average of these two measurements was used to determine the diameters of the follicle and the oocyte, respectively.

#### *2.4. Assessment of apoptosis by immunohistochemistry to active-caspase-3*

Immunohistochemistry was performed as described previously [12] with some modifications. Briefly, sections (4 µm thick) from each block were cut using a microtome

(EasyPath, São Paulo, Brazil) and mounted in Starfrost glass slides (Knittel, Braunschweig, Germany). The slides were incubated in citrate buffer (pH 6.0; Dinâmica) at 95°C in a decklocking chamber (Biocare, Concord, USA) for 40 min to retrieve antigenicity, and endogenous peroxidase activity was prevented by incubation with peroxidase blocker (EasyPath) for 10 min. Nonspecific binding sites were blocked using 1% normal goat serum (EasyPath) and diluted in phosphate-buffered saline (PBS) for 10 min. Subsequently, the sections were incubated in a dark humidified chamber for 50 min at room temperature with rabbit polyclonal anti-activated caspase-3 antibody (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Thereafter, the sections were incubated for 20 min polymer EasyLink One (EasyPath). Protein localization was demonstrated with diaminobenzidine (DAB; EasyPath), and the sections were counterstained with hematoxylin (Vetec) for 1 min. Negative controls (reaction control) were performed in the absence of the rabbit polyclonal antibodies.

For immunohistochemical analysis, only follicles that contained an oocyte nucleus were analyzed using light microscope (Nikon) connected to a computer equipped with Image-Pro Plus<sup>®</sup> software (Media Cybernetics). For activated caspase-3 expression, 40 follicles were evaluated for each treatment and if the oocyte and/or 70% of the surrounding granulosa cells were positively stained (brown staining), the follicle was considered apoptotic [12]. The percentage of apoptotic follicles was calculated as the number of apoptotic follicles out of the total number of follicles ( $\times 100$ ).

### 2.5. Pharmacologic inhibition of PI3K pathway

To evaluate the effect of the pharmacological inhibition of the PI3K pathway on primordial follicle survival and activation *in vitro*, additional pairs of sheep ovaries (n = 12 ovaries from 6 sheep) were collected, transported to the laboratory and fragmented as described above. The ovarian fragments were cultured for 7 days in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> supplemented with 1  $\mu$ g/mL rutin (concentration that showed the best results in the previous culture) in the absence or presence of the 50  $\mu$ M of the PI3K inhibitor LY294002 (Cell Signaling Technologies, Danvers, USA). The inhibitor was added to the  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> and incubated for 1 h at 39°C under 5% CO<sub>2</sub>. Next, the medium was supplemented with 1  $\mu$ g/mL rutin. Total replacement of the medium was performed every 2 days for the culture in the absence or the presence of the PI3K inhibitor (the inhibitor was also replaced). The inhibitor concentration was chosen according to Adhikari et al., [27] and Santos et al., [11]. Each treatment was

repeated six times (six replicates), thus using the ovaries of six different animals. After this culture, the ovarian cortex was fixed, processed and used for histological (follicular morphology and activation and follicular and oocyte diameter) immunohistochemical (apoptosis) analyses as described above.

### 2.6. Evaluation of p-AKT immunostaining

To verify the effectiveness of LY294002 in inhibiting the PI3K pathway, we evaluated Akt phosphorylation in the ovarian cortex (p-Akt: one of the main downstream targets of PI3K - [28]). Following *in vitro* culture for 7 days, the ovarian fragments cultured with 1 µg/mL rutin in the absence or the presence of LY294002 were destined to immunohistochemistry using rabbit polyclonal anti-p-Akt antibody (1:40; Santa Cruz Biotechnology). Using a light microscope (Nikon) under 400x magnification, the immunostaining for p-Akt analysis was performed in preantral follicles that contained an oocyte nucleus and subjectively classified as absent, weak, moderate or strong as described previously [11].

### 2.7. Statistical analysis

The percentages of morphologically normal (survival), apoptotic and primordial and growing follicles (activation) were compared by Chi-squared test and were expressed as percentages. Data of follicular and oocyte diameters were submitted to Shapiro-Wilk test to verify normal distribution of residues and homogeneity of variances. Thereafter, data of follicular and oocyte diameters were submitted to Kruskal-Wallis and the Student-Newman-Keuls tests for comparisons among treatments. The results were expressed as the mean ± SEM. The differences were considered to be statistically significant when  $P < 0.05$ .

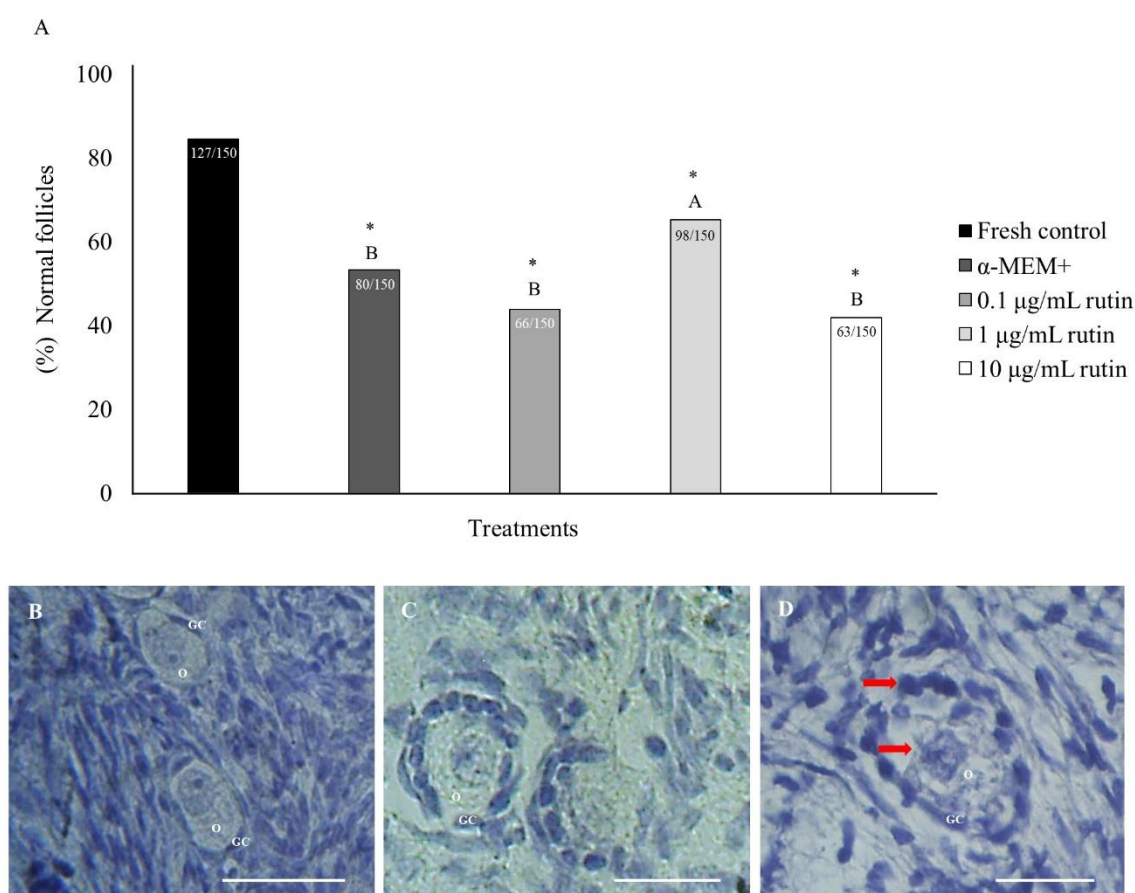
## 3. Results

### 3.1. Follicular morphology and apoptosis after culture with rutin

All treatments reduced ( $P < 0.05$ ) the follicular survival compared to the fresh control (84.66%; Fig. 1A) after *in vitro* culture. However, follicular survival was higher ( $P < 0.05$ ) in

1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rutin (65.33%) than in the  $\alpha\text{-MEM}^+$  (53.33%) and other concentrations of rutin (44% and 42% for 0.1 and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rutin, respectively; Fig. 1A). Overall, the ovine preantral follicles from fresh control (Fig. 1B) and those cultured in the presence of 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rutin (Fig. 1C) had centrally located oocytes and granulosa cells surrounded by normal intact basement membrane, while atretic follicles with retracted oocyte and disorganized and swollen granulosa cells were commonly observed after culture with 0.1 and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rutin (Fig. 1D).

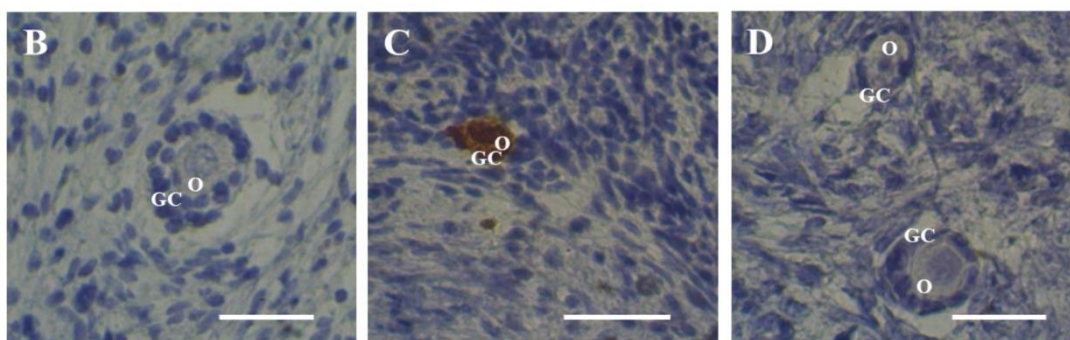
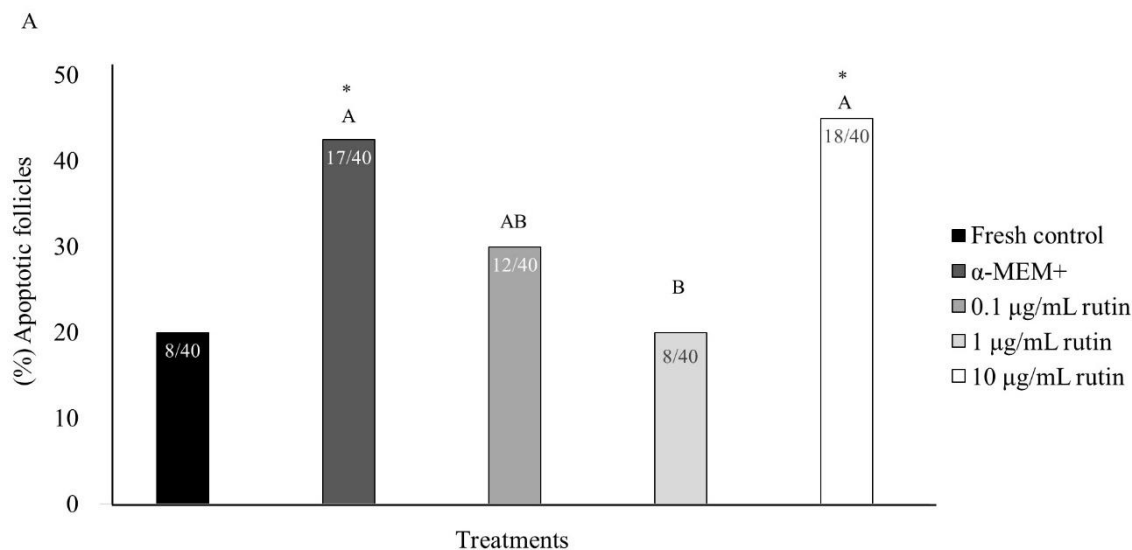
**Figure 1.** Percentages of morphologically normal follicles in the fresh control and after *in vitro* culture in  $\alpha\text{-MEM}^+$  or in the presence of different concentrations of rutin (A). (\*) Differs significantly from fresh control ( $P < 0.05$ ). (A, B) Different letters denote significant differences among treatments ( $P < 0.05$ ). Histological sections in ovine ovarian fragments containing normal follicles in fresh control (B) and after *in vitro* culture in medium containing 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rutin (C), and atretic follicles in medium containing 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rutin (D). Arrow indicates signs of degeneration; O: oocyte; GC: granulosa cells. Scale bars: 50  $\mu\text{m}$  (400x).





After *in vitro* culture, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rutin maintained the percentage of follicular apoptosis (20%; Fig. 2A and B) similar ( $P>0.05$ ) to that of the fresh control (20%) and 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rutin (30%) and lower ( $P<0.05$ ) than  $\alpha\text{-MEM}^+$  (42.5%) and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rutin (45%; Fig. 2A and C). Negative control did not show immunostaining (Fig. 2D).

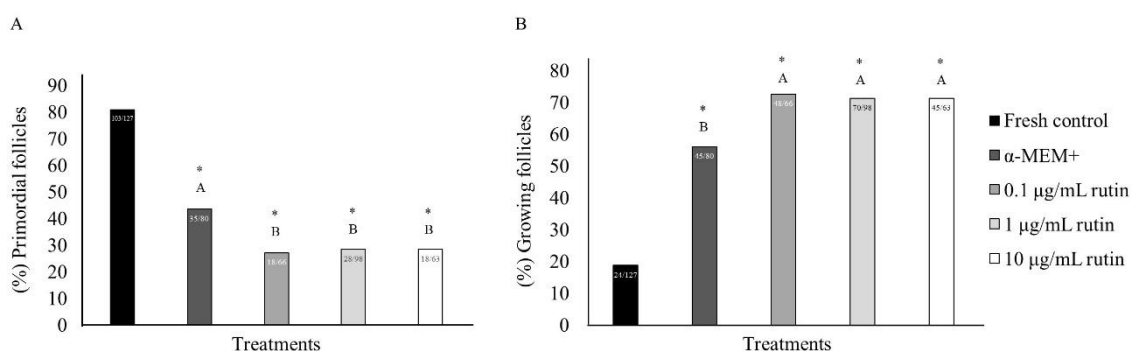
**Figure 2.** Percentage of apoptotic follicles in the fresh control and after *in vitro* culture in  $\alpha\text{-MEM}^+$  or in the presence of different concentrations of rutin (A). (\*) Differs significantly from fresh control ( $P<0.05$ ). (<sup>A, B</sup>) Different letters denote significant differences among treatments ( $P<0.05$ ). Immunohistochemical localization of activated caspase-3 (brown staining): follicles after *in vitro* culture in medium containing 1 and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rutin (B and C, respectively) and negative control (D). O: oocyte; GC: granulosa cells. Scale bars: 50  $\mu\text{m}$  (400x).



### 3.2. *In vitro* follicular activation and growth after culture with rutin

After *in vitro* culture, there was a reduction ( $P < 0.05$ ) in the percentage of primordial follicles (Fig. 3A) in all rutin treatments compared to the fresh control (81.1 %) and  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> (43.75%). In addition, all rutin concentrations (0.1, 1 and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) showed higher ( $P < 0.05$ ) follicular activation (72.72%, 71.42% and 71.42% of growing follicles, respectively) than the fresh control (18.89%) and  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> (56.25%) (Fig. 3B). However, both follicle and oocyte diameters increased ( $P < 0.05$ ) only when tissues were cultured in medium containing 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rutin compared to the fresh control,  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> and other rutin treatments (Table 1).

**Figure 3.** Percentages of normal primordial (A) and growing (B) follicles in the fresh control and after *in vitro* culture in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> or in different concentrations of rutin. (\*) Differs significantly from fresh control ( $P < 0.05$ ). (A, B) Different letters denote significant differences among treatments ( $P < 0.05$ ).



**Table 1.** Mean oocyte and follicular diameters (mean  $\pm$  SEM) in the fresh control and after *in vitro* culture of ovine preantral follicle in different concentrations of rutin.

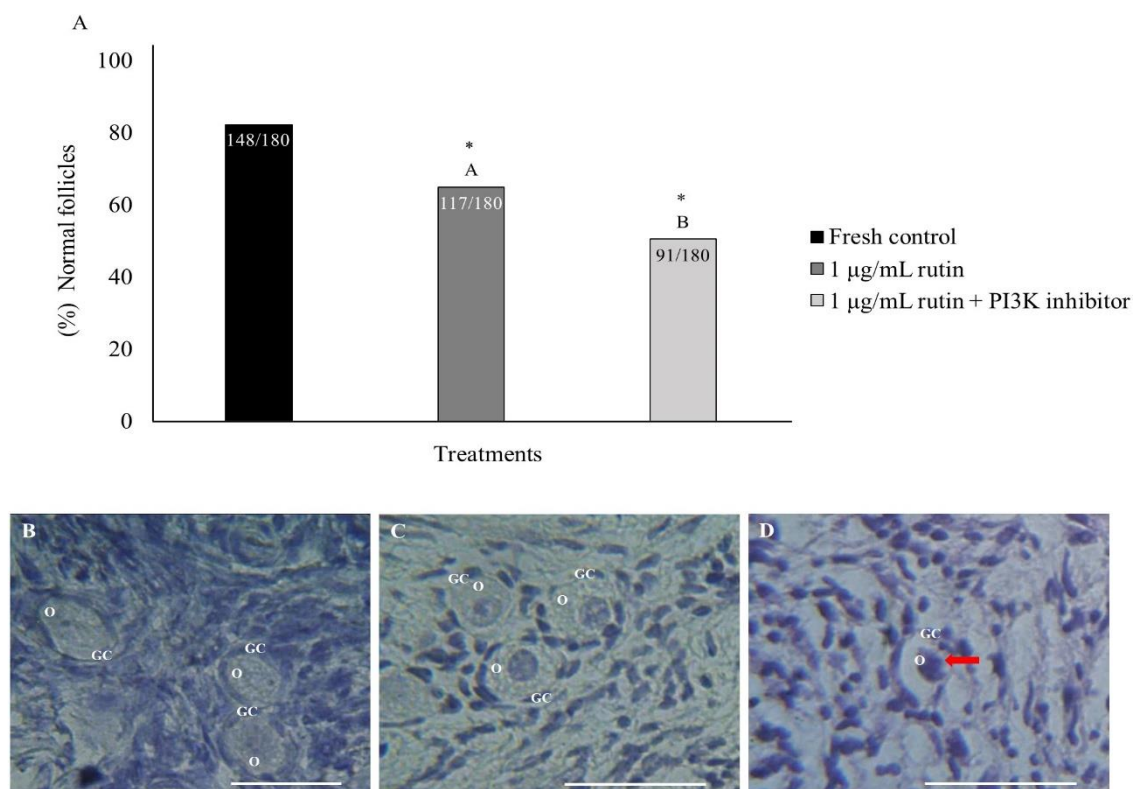
Treatments	Follicular diameter ( $\mu\text{m}$ )	Oocyte diameter ( $\mu\text{m}$ )
Fresh control	55.09 $\pm$ 1.56	37.59 $\pm$ 1.31
$\alpha$ -MEM <sup>+</sup>	52.21 $\pm$ 1.70 <sup>B</sup>	34.10 $\pm$ 1.07 <sup>*C</sup>
0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rutin	51.13 $\pm$ 1.78 <sup>*B</sup>	35.05 $\pm$ 1.15 <sup>BC</sup>
1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rutin	63.87 $\pm$ 2.52 <sup>*A</sup>	43.59 $\pm$ 1.78 <sup>*A</sup>
10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rutin	53.14 $\pm$ 1.66 <sup>B</sup>	37.03 $\pm$ 0.96 <sup>B</sup>

(\*) Differs significantly from fresh control ( $P < 0.05$ ). (A, B, C) Different letters denote significant differences among treatments (within the column;  $P < 0.05$ ).

### 3.3. Follicular morphology, apoptosis, activation and growth after PI3K pathway inhibition

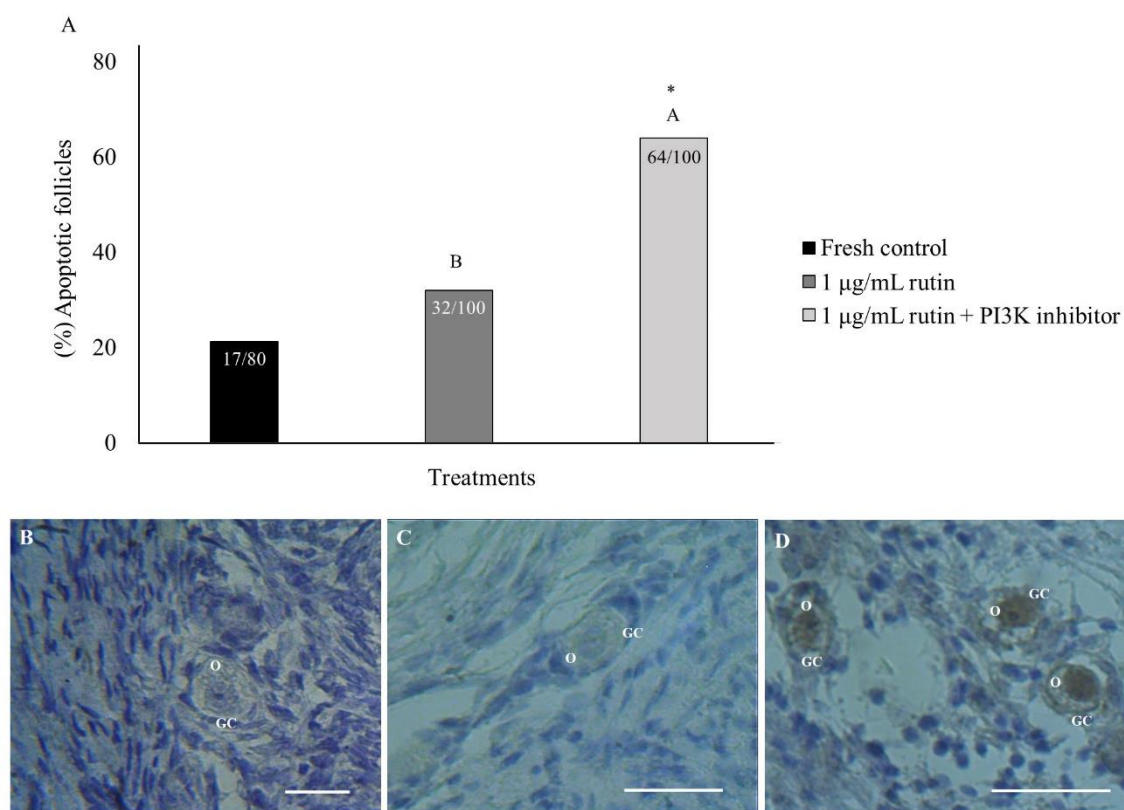
Pharmacologic inhibition of PI3K pathway was performed in the concentration that showed the best results for follicular survival and growth *in vitro* (medium containing 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rutin). After *in vitro* culture, both treatments (without and with PI3K inhibitor) reduced ( $P < 0.05$ ) the follicular survival compared to the fresh control (82.22%; Fig. 4A and B). However, follicular survival was higher ( $P < 0.05$ ) in ovarian tissue cultured with 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rutin in the absence of the inhibitor LY294002 (65%; Fig. 4A and C) in comparison to that cultured in 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rutin plus PI3K inhibitor (50.55%; Fig. 4A and D).

**Figure 4.** Percentages of morphologically normal follicles in the fresh control and after *in vitro* culture in 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rutin in the absence or in the presence of the inhibitor LY294002 (A). (\*) Differs significantly from fresh control ( $P < 0.05$ ). (<sup>A, B</sup>) Different letters denote significant differences among treatments ( $P < 0.05$ ). Histological sections in ovine ovarian fragments containing normal follicles in the fresh control (B) and after culture in medium containing 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rutin in the absence (C) or presence (D) of LY294002. Arrow indicates signs of degeneration; O: oocyte; GC: granulosa cells. Scale bars: 50  $\mu\text{m}$  (400x).



Moreover, the percentage of apoptotic follicles in the fresh control (21.25%; Fig. 5A and B) was similar ( $P>0.05$ ) to that observed after culture with 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rutin in the absence of the inhibitor LY294002 (32%; Fig. 5A and B). Nevertheless, an increase ( $P<0.05$ ) of the follicular apoptosis (64%) was observed after culture with 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rutin plus PI3K inhibitor (Fig. 5A and D).

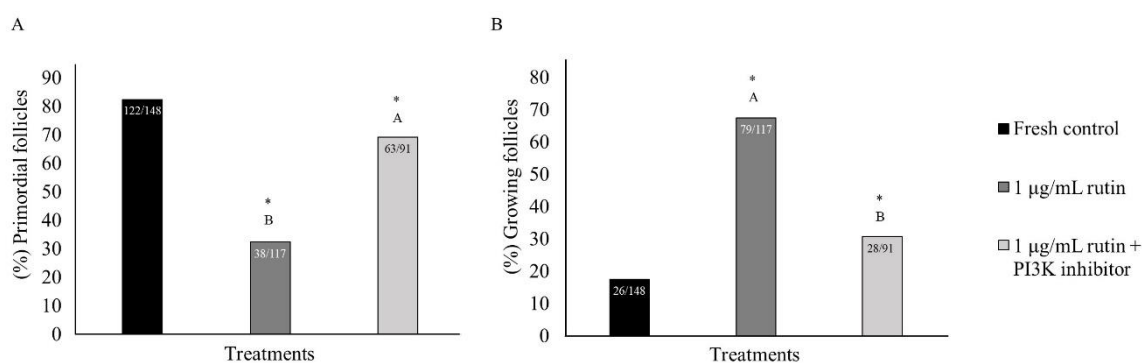
**Figure 5.** Percentage of apoptotic follicles in the fresh control and after *in vitro* culture in 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rutin in the absence or in the presence of the inhibitor LY294002 (A). (\*) Differs significantly from fresh control ( $P<0.05$ ). (<sup>A</sup>, <sup>B</sup>) Different letters denote significant differences among treatments ( $P<0.05$ ). Immunohistochemical localization of activated caspase-3 (brown staining): follicles in the fresh control (B), after culture in 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rutin in the absence (C) or in the presence (D) of LY294002. O: oocyte; GC: granulosa cells. Scale bars: 50  $\mu\text{m}$  (400x).



Although both treatments (without and with PI3K inhibitor) induced ( $P<0.05$ ) primordial follicle activation compared to the fresh control (82.43% and 17.56% for primordial follicles and growing follicles, respectively), there was a reduction ( $P<0.05$ ) in the percentage of activation after PI3K inhibition compared to the medium without the

inhibitor LY294002 (67.52%; Fig. 6A and 6B). Additionally, after PI3K inhibition, there was a decrease ( $P < 0.05$ ) in the follicular and oocyte diameters compared to the fresh control and 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rutin in the absence of the inhibitor LY294002 (Table 2).

**Figure 6.** Percentages of normal primordial (A) and growing (B) follicles in the fresh control and after *in vitro* culture in 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rutin in the absence or in the presence of LY294002. (\*) Differs significantly from fresh control ( $P < 0.05$ ). (A,B) Different letters denote significant differences among treatments ( $P < 0.05$ ).



**Table 2.** Mean oocyte and follicular diameters (mean  $\pm$  SEM) in the fresh control and after *in vitro* culture of ovine preantral follicle in 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rutin alone or with PI3K inhibitor.

Treatments	Follicular diameter ( $\mu\text{m}$ )	Oocyte diameter ( $\mu\text{m}$ )
Fresh control	34.49 $\pm$ 0.48	23.76 $\pm$ 0.39
1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rutin	39.24 $\pm$ 1.0 <sup>*A</sup>	27.62 $\pm$ 0.61 <sup>*A</sup>
1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rutin + PI3K inhibitor	28.49 $\pm$ 0.82 <sup>*B</sup>	19.31 $\pm$ 0.62 <sup>*B</sup>

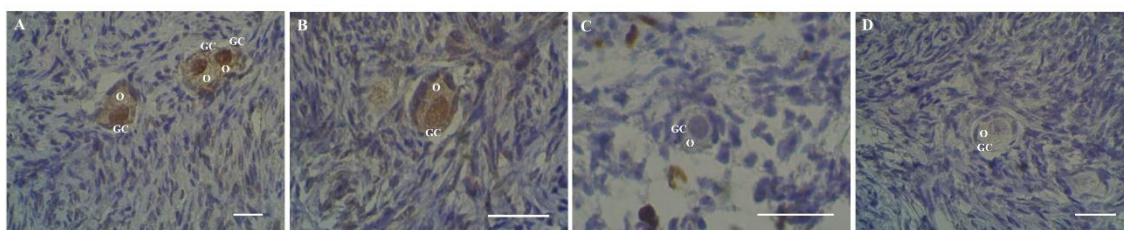
(\*) Differs significantly from fresh control ( $P < 0.05$ ). (A,B) Different letters denote significant differences among treatments (within the column;  $P < 0.05$ ).

### 3.4. p-Akt protein staining after PI3K inhibition

In the ovarian tissues from fresh control (Fig. 7A) and after *in vitro* culture with 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rutin in the absence of the PI3K inhibitor (Fig. 7B), the oocytes from primordial or

intermediate follicles showed a moderate immunostaining for p-Akt. Nevertheless, after PI3K inhibition, p-Akt immunostaining in oocytes was markedly reduced (weak staining) (Fig. 7C). Negative control did not show staining for p-Akt (Fig. 7D).

**Figure 7.** Immunostaining and immunoexpression of p-Akt in ovine preantral follicles in the fresh control (A), after *in vitro* culture with 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rutin in the absence (B) or in the presence (C) of the inhibitor LY294002, and negative control (D). O: oocyte; GC: granulosa cells. Scale bars: 50  $\mu\text{m}$  (400x).



#### 4. Discussion

The present study showed for the first time that the *in vitro* culture of sheep ovarian tissue with rutin promoted primordial follicle activation and growth and prevented apoptosis through the PI3K/Akt pathway. Rutin is a natural nutraceutical with antioxidant, anti-inflammatory and antiapoptotic properties [29]. In our study, *in vitro* culture of ovine ovarian tissue in medium containing 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rutin preserved a higher percentage of normal follicles than the  $\alpha\text{-MEM}^+$  (control medium) and other concentrations of rutin (Fig. 1), as well as showed percentage of apoptotic follicles similar to the fresh control and 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rutin and lower than  $\alpha\text{-MEM}^+$  and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rutin (Fig. 2). A previous study conducted by our group showed that rutin maintained follicular viability and increased GSH levels after culture of isolated ovine secondary follicles [25]. Moreover, studies have showed antioxidant and/or antiapoptotic effects of rutin in murine ovarian tissue after PCOS induction [22], against ischemia-reperfusion injury [23], and ganodotoxic treatment with cisplatin [14], as well as in different organs and cells (testes: [30,31]; bone marrow and spleen: [32]; skin keratinocytes and fibroblasts: [33]; kidney: [34]; liver: [35]). Thus, we believe that 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rutin can maintain follicular survival by the inhibition of oxidative stress and prevention of apoptosis.



In the present study, the percentage of follicular apoptosis after culture in 0.1 µg/mL rutin was similar to those percentages observed in 1 and 10 µg/mL rutin. Moreover, ovarian tissue cultured in 0.1 µg/mL rutin had less normal follicles compared with 1 µg/mL rutin. Thus, it is likely that the lowest concentration of rutin (0.1 µg/mL) was not sufficient to maintain proper follicular architecture and survival. In addition, antioxidant substances, such as rutin, also have a toxic or prooxidant potential depending of the dose administrated to the cells [36]. In our study, the highest rutin concentration (10 µg/mL) reduced the percentage of morphologically normal follicles and increased apoptosis after 7 days of culture, demonstrating a potential cytotoxic effect. Similarly, Sirotkin et al., [37] reported that the concentration of 10 µg/mL rutin reduced viability and proliferation of porcine granulosa cells after *in vitro* culture.

In the current study, all treatments promoted the activation of primordial follicles compared to the fresh control. However, the different concentrations of rutin promoted higher follicular activation than the  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> (Fig. 3). In addition, we clearly observed an improved effect of 1 µg/mL rutin on both follicle and oocyte diameters (Table 1). The initiation of follicle growth is characterized by change in the shape of granulosa cells from flattened to cuboidal, proliferation of these cells, and enlargement of the oocyte [7,38]. *In vitro* studies demonstrated that rutin induces proliferation of fibroblast [39] and periodontal ligament stem cell (PDLSCs) [40]. Therefore, our data indicates that an adequate concentration of rutin (1 µg/mL) may be involved in the ovine primordial follicle activation and growth.

Considering that rutin actions can be regulated by PI3K signaling pathway [41,42], we speculate that this pathway could be involved in the effects of rutin in the survival and initiation of the primordial follicle development in sheep. For this, we exposed ovaries to LY294002, a PI3K inhibitor that has been used in different ovarian cells [10–12]. After PI3K inhibition, the rutin effects in the development of ovine primordial follicles were attenuated, i.e., there was a reduction in the percentage of follicular survival, activation and growth and an increase of the apoptosis. Additionally, we further evaluated the direct effect of LY294002 on Akt phosphorylation, one of the main targets of PI3K pathway [28]. The immunostaining of p-Akt increased in follicles cultured in 1 µg/mL rutin. Nevertheless, inhibition of the PI3K pathway with LY294002 clearly reduced p-Akt expression in the follicles (Fig. 7). Similarly, *in vitro* treatment with LY294002 reversed the beneficial effects of rutin on survival of rat neurons [43] and Leydig cells of mouse [44], as well as on the

proliferation and osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cell (PDLSCs) [40]. Studies have shown that rutin protective actions through AKT phosphorylation (p-AKT) extends to various tissues (brain: [45]; liver: [41]; retinal ganglion cell: [46]; heart: [42]). Thus, our results reflect the possibility of the direct effect of rutin on the survival and development of ovine primordial follicles through the regulation of PI3K/Akt pathway.

In our study, it is important to highlight that culture of ovine ovarian tissue with LY294002 plus rutin did not entirely inhibit the *in vitro* activation of primordial follicles (Fig. 6). This result may indicate that others pathway can be involved in the activation of sheep primordial follicles stimulated by rutin. Further studies to evaluate other signaling pathways or an interaction between different pathways will be of interest to clarify the underlying molecular mechanisms of rutin in the sheep ovary.

In conclusion, at a concentration of 1  $\mu\text{g/mL}$ , rutin reduces apoptosis, promotes activation and growth of sheep primordial follicle through the modulation of the PI3K/Akt signaling pathway after *in vitro* culture of ovine ovarian tissue. The study of the pathways involved in mammalian folliculogenesis, such as PI3K/Akt pathway, may be an important approach to maximize the number of viable mature oocytes of domestic animals and also to decipher the effects of different agents on ovarian function.

### **Acknowledgements**

T.L.B.G. Lins holds a scholarship from the FACEPE, Brazil. M.H.T. Matos is supported by a grant from the CNPq, Brazil.

### **Declaration of interest**

None of the authors have any conflict of interest to declare.

### **References**

- [1] McLaughlin M, Albertini DF, Wallace WHB, Anderson RA, Telfer EE. Metaphase II oocytes from human unilaminar follicles grown in a multistep culture system. *Mol Hum Reprod* 2018;24:135–42. <https://doi.org/10.1093/molehr/gay002>.
- [2] Telfer EE. Future developments: In vitro growth (IVG) of human ovarian follicles.



- Acta Obstet Gynecol Scand 2019;98:653–8. <https://doi.org/10.1111/aogs.13592>.
- [3] Figueiredo JR, Cadenas J, de Lima LF, Santos RR. Advances in in vitro folliculogenesis in domestic ruminants. *Anim Reprod* 2019;16:52–65. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0123>.
- [4] Sonigo C, Beau I, Binart N, Grynberg M. The impact of chemotherapy on the ovaries: Molecular aspects and the prevention of ovarian damage. *Int J Mol Sci* 2019;20. <https://doi.org/10.3390/ijms20215342>.
- [5] Heiligentag M, Eichenlaub-Ritter U. Preantral follicle culture and oocyte quality. *Reprod Fertil Dev* 2018;30:18–43. <https://doi.org/10.1071/RD17411>.
- [6] Alam MH, Miyano T. Interaction between growing oocytes and granulosa cells in vitro. *Reprod Med Biol* 2020;19:13–23. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12292>.
- [7] Hardy K, Mora JM, Dunlop C, Carzaniga R, Franks S, Fenwick MA. Nuclear exclusion of SMAD2/3 in granulosa cells is associated with primordial follicle activation in the mouse ovary. *J Cell Sci* 2018;131. <https://doi.org/10.1242/jcs.218123>.
- [8] Granados-Aparici S, Hardy K, Franks S, Sharum IB, Waite SL, Fenwick MA. SMAD3 directly regulates cell cycle genes to maintain arrest in granulosa cells of mouse primordial follicles. *Sci Rep* 2019;9:1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42878-4>.
- [9] Zhao Q, Ma Y, Sun N xia, Ye C, Zhang Q, Sun S han, et al. Exposure to bisphenol A at physiological concentrations observed in Chinese children promotes primordial follicle growth through the PI3K/Akt pathway in an ovarian culture system. *Toxicol Vitr* 2014;28:1424–9. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.07.009>.
- [10] Fujihara M, Comizzoli P, Keefer CL, Wildt DE, Songsasen N. Epidermal growth factor (EGF) sustains in vitro primordial follicle viability by enhancing stromal cell proliferation via mapk and PI3K pathways in the prepubertal, but not adult, cat ovary. *Biol Reprod* 2014;90. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.115089>.
- [11] Santos JMS, Lins TLBG, Barberino RS, Menezes VG, Gouveia BB, Matos MHT. Kaempferol promotes primordial follicle activation through the phosphatidylinositol

- 3-kinase/protein kinase B signaling pathway and reduces DNA fragmentation of sheep preantral follicles cultured in vitro. *Mol Reprod Dev* 2019;86:319–29. <https://doi.org/10.1002/mrd.23107>.
- [12] Barberino RS, Santos JMS, Lins TLBG, Menezes VG, Monte APO, Gouveia BB, et al. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces apoptosis of preantral follicles through the phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) signaling pathway after in vitro culture of sheep ovarian tissue. *Theriogenology* 2020;155:25–32. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.05.037>.
- [13] Monte APO, Bezerra MÉS, Menezes VG, Gouveia BB, Barberino RS, Lins TLBG, et al. Involvement of Phosphorylated Akt and FOXO3a in the Effects of Growth and Differentiation Factor-9 (GDF-9) on Inhibition of Follicular Apoptosis and Induction of Granulosa Cell Proliferation After In Vitro Culture of Sheep Ovarian Tissue. *Reprod Sci* 2021. <https://doi.org/10.1007/s43032-020-00409-x>.
- [14] Lins TLBG, Gouveia BB, Barberino RS, Silva RLS, Monte APO, Pinto JG., et al. Rutin prevents cisplatin-induced ovarian damage via antioxidant activity and regulation of PTEN and FOXO3a phosphorylation in mouse model. *Reprod Toxicol* 2020. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.10.001>.
- [15] Ganeshpurkar A, Saluja AK. The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharm J* 2017;25:149–64. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.04.025>.
- [16] Vázquez-Flores LF, Casas-Grajales S, Hernández-Aquino E, Vargas-Pozada EE, Muriel P. Antioxidant, Antiinflammatory, and Antifibrotic Properties of Quercetin in the Liver. *Liver Pathophysiol. Ther. Antioxidants*, 2017, p. 653–74. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804274-8.00047-3>.
- [17] Carvalho TT, Mizokami SS, Ferraz CR, Manchope MF, Borghi SM, Fattori V, et al. The granulopoietic cytokine granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) induces pain: analgesia by rutin. *Inflammopharmacology* 2019;27:1285–96. <https://doi.org/10.1007/s10787-019-00591-8>.
- [18] Saleh A, ElFayoumi HM, Youns M, Barakat W. Rutin and orlistat produce antitumor effects via antioxidant and apoptotic actions. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2019;392:165–75. <https://doi.org/10.1007/s00210-018-1579-0>.

- [19] Oboh G, Adebayo AA, Ademosun AO, Olowokere OG. Rutin restores neurobehavioral deficits via alterations in cadmium bioavailability in the brain of rats exposed to cadmium. *Neurotoxicology* 2020;77:12–9. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2019.12.008>.
- [20] Li B, Yang X. Rutin-loaded cellulose acetate/poly(ethylene oxide) fiber membrane fabricated by electrospinning: A bioactive material. *Mater Sci Eng C* 2020;109:110601. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110601>.
- [21] Hadigol T, Sobhani A, Hemadi M, Nekoonam S, Shams A, Eslami Farsani B, et al. The Effect of Rutin on Progesterone and Estrogen Receptor Expression in Uterine Endometrial Tissue in the Heterotopic Transplantation of Newborn Mouse Ovary. *Iran Red Crescent Med J* 2019;21. <https://doi.org/10.5812/ircmj.86289>.
- [22] Jahan S, Munir F, Razak S, Mehboob A, Ain QU, Ullah H, et al. Ameliorative effects of rutin against metabolic, biochemical and hormonal disturbances in polycystic ovary syndrome in rats. *J Ovarian Res* 2016;9:1–9. <https://doi.org/10.1186/s13048-016-0295-y>.
- [23] Nayki C, Nayki U, Keskin Cimen F, Kulhan M, Yapca OE, Kurt N, et al. The effect of rutin on ovarian ischemia-reperfusion injury in a rat model. *Gynecol Endocrinol* 2018;34:809–14. <https://doi.org/10.1080/09513590.2018.1450378>.
- [24] Aherne SA, O'Brien NM. The flavonoids, myricetin, quercetin and rutin, protect against cholestan-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol- induced toxicity in Chinese hamster ovary cells in vitro. *Nutr Res* 1999;19:749–60. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(99\)00037-8](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(99)00037-8).
- [25] Lins TLBG, Cavalcante AYP, Santos JMS, Menezes VG, Barros VRP, Barberino RS, et al. Rutin can replace the use of three other antioxidants in the culture medium, maintaining the viability of sheep isolated secondary follicles. *Theriogenology* 2017;89:263–70. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.019>.
- [26] Silva JRV, Van Den Hurk R, De Matos MHT, Dos Santos RR, Pessoa C, De Moraes MO, et al. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue. *Theriogenology* 2004;61:1691–704. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.09.014>.

- [27] Adhikari D, Risal S, Liu K, Shen Y. Pharmacological Inhibition of mTORC1 Prevents Over-Activation of the Primordial Follicle Pool in Response to Elevated PI3K Signaling. *PLoS One* 2013;8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053810>.
- [28] Cecconi S, Mauro A, Cellini V, Patacchiola F. The role of Akt signalling in the mammalian ovary. *Int J Dev Biol* 2012;56:809–17. <https://doi.org/10.1387/ijdb.120146sc>.
- [29] Gęgotek A, Rybałtowska-Kawałko P, Skrzydlewska E. Rutin as a Mediator of Lipid Metabolism and Cellular Signaling Pathways Interactions in Fibroblasts Altered by UVA and UVB Radiation. *Oxid Med Cell Longev* 2017;2017. <https://doi.org/10.1155/2017/4721352>.
- [30] Aksu EH, Kandemir FM, Özkaraca M, Ömür AD, Küçükler S, Çomaklı S. Rutin ameliorates cisplatin-induced reproductive damage via suppression of oxidative stress and apoptosis in adult male rats. *Andrologia* 2017;49. <https://doi.org/10.1111/and.12593>.
- [31] Mehfooz A, Wei Q, Zheng K, Fadlalla MB, Maltasic G, Shi F. Protective roles of Rutin against restraint stress on spermatogenesis in testes of adult mice. *Tissue Cell* 2018;50:133–43. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2018.01.003>.
- [32] Singh A, Yashavarddhan MH, Kalita B, Ranjan R, Bajaj S, Prakash H, et al. Podophyllotoxin and rutin modulates ionizing radiation-induced oxidative stress and apoptotic cell death in mice bone marrow and spleen. *Front Immunol* 2017;8:1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00183>.
- [33] Gęgotek A, Ambrożewicz E, Jastrząb A, Jaročka-Karpowicz I, Skrzydlewska E. Rutin and ascorbic acid cooperation in antioxidant and antiapoptotic effect on human skin keratinocytes and fibroblasts exposed to UVA and UVB radiation. *Arch Dermatol Res* 2019;311:203–19. <https://doi.org/10.1007/s00403-019-01898-w>.
- [34] Al-Harbi NO, Imam F, Al-Harbi MM, Al-Shabanah OA, Alotaibi MR, As Sobeai HM, et al. Rutin inhibits carfilzomib-induced oxidative stress and inflammation via the NOS-mediated NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Inflammopharmacology* 2019;27:817–27. <https://doi.org/10.1007/s10787-018-0550-5>.
- [35] Oludele OJ, Adisa BA, Olufunso OO. Regulated rutin co-administration reverses

- mitochondrial-mediated apoptosis in *Plasmodium berghei*-infected mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2020;522:328–34.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.11.067>.
- [36] Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 2011;82:513–23.  
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.01.018>.
- [37] Sirotkin A V., Pelleova B, Fabova Z, Makovicky P, Alwasel S, Harrath AH. Rutin directly affects stimulatory action of FSH on the ovarian cell. *PharmaNutrition* 2021;15:100247. <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2020.100247>.
- [38] Kallen A, Polotsky AJ, Johnson J. Untapped Reserves: Controlling Primordial Follicle Growth Activation. *Trends Mol Med* 2018;24:319–31.  
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.01.008>.
- [39] Han SY, Chu JX, Li GM, Zhu LS, Shi RF. Effects of rutin from leaves and flowers of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.) on angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and proliferation of fibroblasts. *Lat Am J Pharm* 2010;29:137–40.
- [40] Zhao B, Xiong Y, Zhang Y, Jia L, Zhang W, Xu X. Rutin promotes osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells through the GPR30-mediated PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Exp Biol Med* 2020;245:552–61.  
<https://doi.org/10.1177/1535370220903463>.
- [41] Liang W, Zhang D, Kang J, Meng X, Yang J, Yang L, et al. Protective effects of rutin on liver injury in type 2 diabetic db/db mice. *Biomed Pharmacother* 2018;107:721–8. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.046>.
- [42] Fei J, Sun Y, Duan Y, Xia J, Yu S, Ouyang P, et al. Low concentration of rutin treatment might alleviate the cardiotoxicity effect of pirarubicin on cardiomyocytes via activation of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Biosci Rep* 2019;39:1–14.  
<https://doi.org/10.1042/BSR20190546>.
- [43] Wang R, Sun Y, Huang H, Wang L, Chen J, Shen W. Rutin, A Natural Flavonoid Protects PC12 Cells Against Sodium Nitroprusside-Induced Neurotoxicity Through Activating PI3K/Akt/mTOR and ERK1/2 Pathway. *Neurochem Res* 2015;40:1945–

53. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1690-2>.
- [44] Sun J, Wang H, Liu B, Shi W, Shi J, Zhang Z, et al. Rutin attenuates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidation damage and apoptosis in Leydig cells by activating PI3K/Akt signal pathways. *Biomed Pharmacother* 2017;88:500–6. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.066>.
- [45] Thabet NM, Moustafa EM. Protective effect of rutin against brain injury induced by acrylamide or gamma radiation: role of PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$ /NRF-2 signalling pathway. *Arch Physiol Biochem* 2018;124:185–93. <https://doi.org/10.1080/13813455.2017.1374978>.
- [46] Li Y, Qin L, Ying L, Dong H, Wang D. Rutin prevents retinal ganglion cell death and exerts protective effects by regulating transforming growth factor- $\beta$ 2/smad2/3akt/PTEN signaling in experimental rat glaucoma. *Trop J Pharm Res* 2019;18:985–93. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v18i5.11>.

**Capítulo II.****Rutin prevents cisplatin-induced ovarian damage via antioxidant activity and regulation of PTEN and FOXO3a phosphorylation in mouse model**

(Rutina previne danos ovarianos induzidos pela cisplatina por meio da atividade antioxidante e regulação da fosforilação de PTEN e FOXO3a em modelo de camundongo)

Thae Lanne B. G. Lins<sup>A</sup>, Bruna B. Gouveia<sup>A</sup>, Ricássio S. Barberino<sup>A</sup>, Regina L. S. Silva<sup>A</sup>,  
Alane P. O. Monte<sup>A</sup>, Joisyleide G. C. Pinto<sup>A</sup>, Daniela S. P. Campinho<sup>A</sup>, Raimundo  
C. Palheta Jr<sup>B</sup>, Maria H. T. Matos<sup>A</sup>

<sup>A</sup>Nucleus of Biotechnology Applied to Ovarian Follicle Development, Federal University  
of São Francisco Valley, 56300-990, Petrolina-PE, Brazil

<sup>B</sup>Laboratory of Veterinary Pharmacology, Department of Veterinary Medicine, Federal  
University of São Francisco Valley, 56300-990, Petrolina-PE, Brazil

**Artigo publicado no periódico Reproductive Toxicology**

**(DOI: 10.1016/j.reprotox.2020.10.001)**

**(Qualis A4 na área de Biotecnologia; Fator de impacto: 3,1) – Anexo 2**

**Capítulo III.**

Rutin prevents doxorubicin-induced ovarian damage via antioxidant activity in mice

(Rutina previne danos ovarianos induzidos pela doxorubicina por meio da atividade antioxidante em camundongos)

Thae Lanne B. G. Lins<sup>A</sup>, Regina L. S. Silva<sup>A</sup>, Ricássio S. Barberino<sup>A</sup>, Alane P. O. Monte<sup>A</sup>,  
Daniela S. P. Campinho<sup>A</sup>, Raimundo C. Palheta Jr<sup>B</sup>,  
Maria H. T. Matos\*<sup>A</sup>

<sup>A</sup>Nucleus of Biotechnology Applied to Ovarian Follicle Development, Federal University of São Francisco Valley, 56300-990, Petrolina-PE, Brazil

<sup>B</sup>Laboratory of Veterinary Pharmacology, Department of Veterinary Medicine, Federal University of São Francisco Valley, 56300-990, Petrolina-PE, Brazil

**Manuscrito em redação (faltam as análises das vias de sinalização)**



**Rutin prevents doxorubicin-induced ovarian damage via antioxidant activity in mice**

Thae Lanne B. G. Lins<sup>A</sup>, Regina L. S. Silva<sup>A</sup>, Ricássio S. Barberino<sup>A</sup>, Alane P. O. Monte<sup>A</sup>,  
Daniela S. P. Campinho<sup>A</sup>, Raimundo C. Palheta Jr<sup>B</sup>,  
Maria H. T. Matos<sup>\*A</sup>

<sup>A</sup>Nucleus of Biotechnology Applied to Ovarian Follicle Development, Federal University  
of São Francisco Valley, 56300-990, Petrolina-PE, Brazil

<sup>B</sup>Laboratory of Veterinary Pharmacology, Department of Veterinary Medicine, Federal  
University of São Francisco Valley, 56300-990, Petrolina-PE, Brazil

Running head: Rutin against doxorubicin in murine ovary

\*Correspondence should be addressed to:

Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF)

Colegiado de Medicina Veterinária - Laboratório de Biologia Celular, Citologia e Histologia

Rodovia BR 407, Km 12, Lote 543 - Projeto de Irrigação Nilo Coelho - S/N, C1

CEP: 56300-990 - Petrolina - PE – Brasil. Tel.: +55.87.2101.4839

Corresponding author. Email: [helena.matos@univasf.edu.br](mailto:helena.matos@univasf.edu.br) (M. H. T. Matos)

## Abstract

The aims of the present study were to evaluate the protective effects of rutin during doxorubicin-induced ovarian toxicity in mice. Mice received saline solution (control, 0.15 M, i.p.) or doxorubicin (10 mg/kg body weight, i.p.) or they were pre and posttreated with rutin (10, 30 or 50 mg/kg body weight, p.o.) before and after doxorubicin (10 mg/kg body weight, i.p.) once daily for 5 days. Next, the ovaries were harvested and destined to histological (follicular morphology and activation), immunohistochemical (cell proliferation and apoptosis) and fluorescence (glutathione [GSH] and mitochondrial activity) analyses. The results showed that treatment with 30 mg/kg rutin before and after doxorubicin preserved the percentage of normal follicles and cell proliferation, reduced apoptosis and increased active mitochondria and GSH levels compared to the doxorubicin treatment ( $P < 0.05$ ). In conclusion, treatment with 30 mg/kg rutin has the potential to protect the ovarian follicles against doxorubicin-induced toxicity through its antioxidant effects.

**Keywords:** Oxidative stress, Flavonoid, Ovarian function, Chemotherapy, Vitamin P.

## 1. Introduction

The anthracycline doxorubicin or adriamycin is a drug of choice for the treatment of different types of cancer, including breast cancer and ovary (Nishi *et al.*, 2018; Ding *et al.*, 2019; Jin *et al.*, 2019). However, antineoplastic therapy with doxorubicin may lead to loss of primordial follicles, resulting in the depletion of the ovarian reserve and consequent premature ovarian failure (Xiao *et al.*, 2017; Spears *et al.*, 2019; Szymanska, Tan and Oktay, 2020). The toxic effects of doxorubicin in the ovary are associated with DNA lesion, increase of reactive oxygen species (ROS) levels and damage to the mitochondria, blood vessels and cortex, which finally lead to inflammation, decreased cell proliferation, ovarian oxidative injury and follicular apoptosis (Zhang *et al.*, 2017; Spears *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019; Lopes *et al.*, 2020). Therefore, it becomes important the use of protective drugs that can prevent follicular loss during chemotherapy with doxorubicin (Spears *et al.*, 2019; Samare-Najaf, Zal and Safari, 2020). In this context, rutin appears as a promising cytoprotective substance against gonadotoxicity during chemotherapy exposure.

Rutin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone-3-ramnoglycoside), also known as vitamin P, is a bioflavonoid that is present in citrus, fig, apple, tea, asparagus, onion, mulberry and buckwheat (Farha *et al.*, 2020). Rutin is a natural dietary compound with anticancer, antibacterial, anti-inflammatory, antioxidant and antiapoptotic effects, and can be used in functional foods, dietary supplements, and therapeutic use of pharmaceuticals for the prevention of disease (Al-Harbi *et al.*, 2019; Caglayan *et al.*, 2019; Farha *et al.*, 2020; Li and Yang, 2020). In experimental antineoplastic therapy, rutin prevented the damage in the testes (Deihimi *et al.*, 2017), kidney (Al-Harbi *et al.*, 2019), peripheral nervous system (Yaşar *et al.*, 2019) and blood (Erkan *et al.*, 2020), as well as preserved the male and female fertility when associated with chemotherapy treatment with doxorubicin or cisplatin, respectively (Salem, Salem and Hellstrom, 2017; Lins *et al.*, 2020). Moreover, rutin protects against doxorubicin-induced neurotoxicity without affecting its antitumor potential in a murine model of mammary carcinoma (Ramalingayya *et al.*, 2019). These positive results can be related to the antioxidant effects of the rutin like inhibition of oxidative stress, increase in the activity of glutathione (GSH), prevention of lipid peroxidation, mitochondrial dysfunction and apoptosis (Caglayan *et al.*, 2019; Qu *et al.*, 2019; Yaşar *et al.*, 2019). However, the effects of rutin against doxorubicin-induced ovarian toxicity in mice have not been investigated.

Current research has shown that exposure to doxorubicin significantly decreased follicle health in human and mouse, supporting the suitability of the mouse as a model for the human ovary (Lopes *et al.*, 2020). Therefore, the aims of this study were to evaluate whether treatment with rutin before and after doxorubicin administration could preserve ovarian follicle morphology, and affect primordial follicle activation, cell proliferation, apoptosis, GSH levels and mitochondrial activity in mice.

## **2. Material and Methods**

### *2.1. Animals*

This study was conducted according to the ethical guidelines of the Ethics Committee on Animal Use at the Federal University of San Francisco Valley (protocol number

0004/280918). Adult female Swiss mice (n = 25), aged 8 weeks and weighing between 30 and 45 g, were housed in an air-conditioned atmosphere at a temperature of 25°C with alternating 12 h light and dark cycles. Animals were maintained on a standard diet (Presence Rats and Mice® - Agribands Purina do Brazil Ltda, Paulínia, Brazil) and water was administered *ad libitum*.

## 2.2. Experimental design (chemotherapy)

Animals (n = 25) were randomly divided into five groups (5 animals per group) and treated for 5 days as follows. Mice of the first (control) and second (doxorubicin-DOX; Bergamo, São Paulo, Brazil) groups were treated with saline solution (NaCl 0.15 M, 0.3 mL/mouse; Sigma Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) orally by gavage (p.o.), once a day, for 5 days. On the third day of treatment, after 1 h of oral administration of saline solution, the mice received intraperitoneal injection (i.p.) of saline solution (NaCl 0.15 M, 0.15 mL/mouse) or doxorubicin (10 mg/kg body weight; WANG et al., 2019), respectively. For the third, fourth and fifth groups, the mice received rutin (Sigma Aldrich Chemical Co.) in doses of 10, 30 or 50 mg/kg body weight (v.o., gavage; LINS et al., 2020), respectively, once a day for 5 days. On the third day, after 1 h of the administration of rutin, the mice received doxorubicin (10 mg/kg of body weight, i.p.). Twenty four hours after the last administration of substances, the animals received ketamine and xylazine administration and were euthanized by cervical dislocation. Ovarian tissues were dissected, washed in phosphate-buffered saline (PBS; Sigma Aldrich Chemical Co.), and used for histological, immunohistochemical and fluorescence analyses.

## 2.3. Morphological analysis and assessment of follicular activation

For morphological examination, the ovaries (one ovary per animal) were fixed in 10% buffered formalin (Dinâmica, São Paulo, Brazil) for 18-24 h, dehydrated using graded ethanol (Dinâmica), clarified in xylene (Dinâmica), and embedded in paraffin (Dinâmica). Hematoxylin and eosin (Vetec, São Paulo, Brazil) was used to stain 5- $\mu$ m thick serial sections for routine histological examination under a light microscope (Nikon, Tokyo, Japan). Follicles were classified based on the (Pedersen and Peters, 1968) morphological

criteria, as described previously, in primordial (one layer of flattened or flattened and cuboidal granulosa cells), primary (a complete layer of cuboidal granulosa cells surrounding the oocyte), secondary (two or more layers of cuboidal granulosa cells and no sign of antrum formation), and antral (multiple granulosa cell layers with some antral space) follicles. In addition, the follicles were classified as histologically normal when an intact oocyte was present and surrounded by granulosa cells that were well organized in one or more layers and had no condensed nuclear chromatin. Atretic follicles were defined as those with a shrunken or vacuolated oocyte, condensed chromatin, disorganized granulosa cells detached from the basement membrane, or cell swelling according to (Lins *et al.*, 2020). Blind follicle counting was performed on every fifth section of the ovaries by one experienced investigator.

To evaluate follicular activation (transition from primordial to growing follicles), only morphologically normal follicles were recorded, and the proportion of primordial and growing (primary; secondary and antral) follicles was calculated in different treatments.

#### 2.4. Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed according to a previous study (Lins *et al.*, 2020). Sections (5  $\mu\text{m}$  thick) from each paraffin block were cut using a microtome (EasyPath, São Paulo, Brazil) and mounted in Starfrost glass slides (Knittel, Braunschweig, Germany). The slides were incubated in citrate buffer (pH 6.0; Dinâmica) at 95°C in a decklocking chamber (Biocare, Concord, USA) for 40 min to retrieve antigenicity, and endogenous peroxidase activity was prevented by incubation with peroxidase blocker (EasyPath) for 10 min. Nonspecific binding sites were blocked using 1% normal goat serum (EasyPath) and diluted in PBS for 10 min. Subsequently, the sections were incubated in a humidified chamber for 50 min at room temperature with rabbit polyclonal anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA; 1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), and anti-activated caspase-3 (1:100; Santa Cruz Biotechnology). Thereafter, the sections were incubated with polymer EasyLink One (EasyPath). Protein localization was demonstrated with diaminobenzidine (DAB; EasyPath), and the sections were counterstained with hematoxylin (Vetec) for 1 min. Negative controls (reaction control) underwent all steps except the primary antibody incubation. Images were taken using a light microscope (Nikon) with a camera. Using the Image-Pro Plus® software (Media Cybernetics, Warrendale, PA,

USA), the number of PCNA-positive granulosa and theca cells was counted in 10 random fields per treatment. The percentage of PCNA-positive cells was calculated as the number of proliferating cells out of the total number of cells ( $\times 100$ ). For activated caspase-3 immunolocalization, the follicle was considered apoptotic if the oocyte and/or 25% of granulosa cells were positively stained (adaptation of DESMEULES; DEVINE, 2006). The percentage of apoptosis was calculated as the number of apoptotic follicles on the total number of follicles ( $\times 100$ ).

### *2.5. Intracellular levels of reactive oxygen species, glutathione, and mitochondrial activity*

The intracellular levels of ROS, GSH and mitochondrial activity were measured using already described methods (Lins *et al.*, 2020). Briefly, 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA; Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), 4-chloromethyl-6.8-difluoro-7- hydroxycoumarin (CellTracker® Blue; CMF2HC; Invitrogen Corporation), and Mitotracker Red (Mitotracker® Red, CMXRos, Molecular Probes, Melbourne, Victoria, Australia) were used to detect the levels of ROS, GSH, and mitochondrial activity as green, blue, and red fluorescence, respectively. Follicles ( $n = 40$  follicles in each treatment) in different stages of development (primordial, primary, secondary, and small antral follicles) were mechanically isolated using 26-G needles from the ovaries (one ovary per animal) and incubated in the dark for 30 min in PBS (Sigma Aldrich Chemical Co.) added with  $10 \mu\text{M}$  H2DCFDA,  $10 \mu\text{M}$  CellTracker Blue, and  $100 \text{ nM}$  Mitotracker Red. After incubation, the follicles were washed in PBS (Sigma Aldrich Chemical Co.) for 30 min and fluorescence was observed under an epifluorescence microscope (Nikon) with UV filters (460 nm for ROS, 370 nm for GSH, and 579 nm for active mitochondria). The fluorescence intensities were analyzed using the Image J software (Version 1.41; National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

### *2.6. Statistical analysis*

The percentages of morphologically normal follicles, primordial, and growing (primary, secondary, and antral follicles), data from PCNA-positive cells and activated

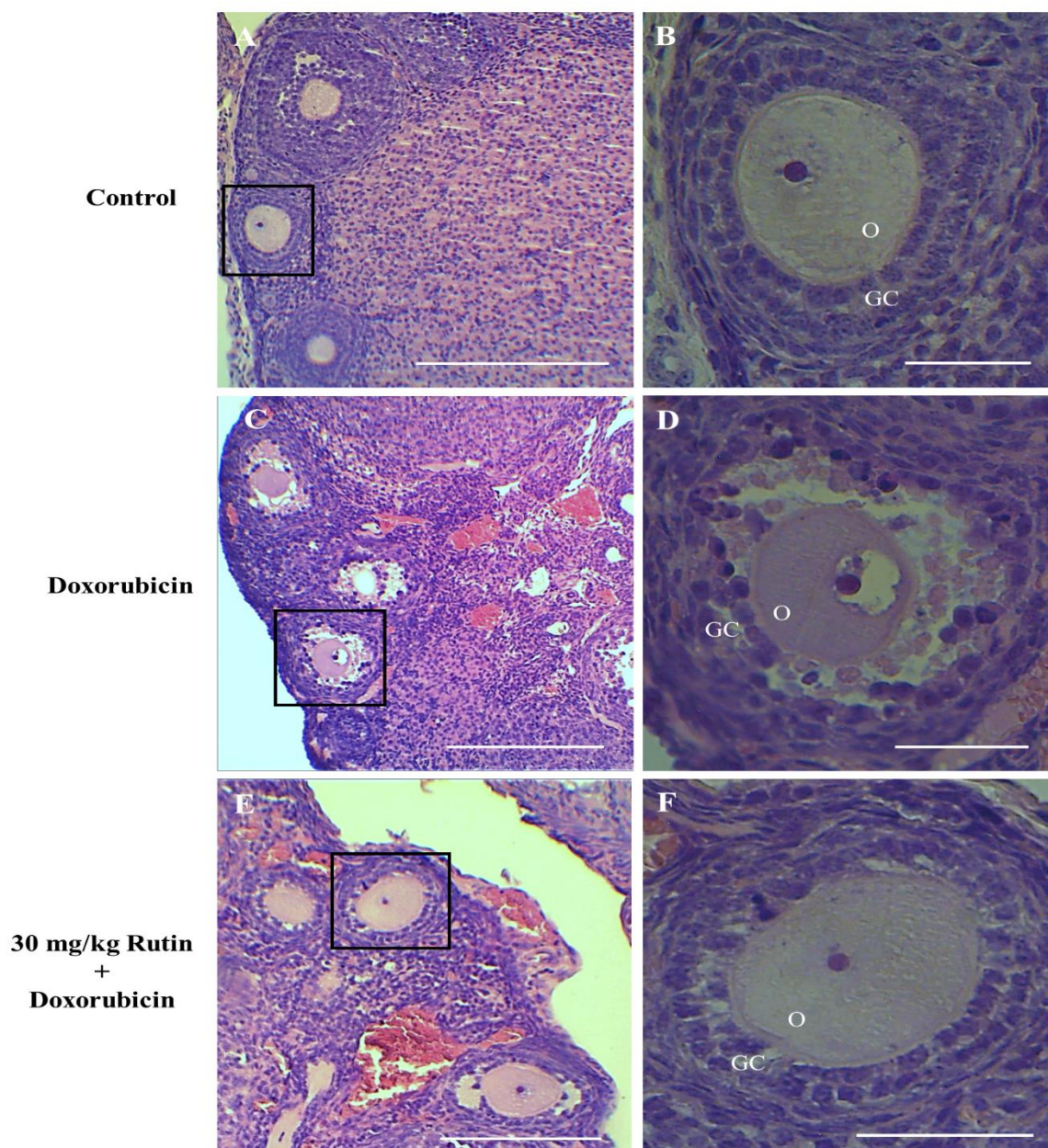
caspase-3 were submitted to the Chi-squared test. Data from GSH and mitochondrial activity were submitted to the Shapiro-Wilk test to verify the normal distribution of residuals and homogeneity of variances. Thereafter, the Kruskal-Wallis nonparametric test was used for comparisons, when these were significant, means were compared by the Student-Newman-Keuls. The results were expressed as percentage or pixels/oocyte, and differences were considered significant when  $P < 0.05$ .

### **3. Results**

#### *3.1. Follicular morphology and primordial follicle activation*

Ovaries from mice of the control group showed normal follicular morphology with centrally located oocytes and granulosa cells surrounded by normal intact basement membrane (Figures 1A and B). The doxorubicin treatment damaged ovarian follicle structure, showing follicles with disorganized granulosa cells and vacuolated oocytes (Figures 1C and D). Nevertheless, treatment with 30 (Figures 1E and F) or 50 mg/kg rutin decreased the follicular damage caused by doxorubicin, and the follicles showed morphological features similar to those of the control group.

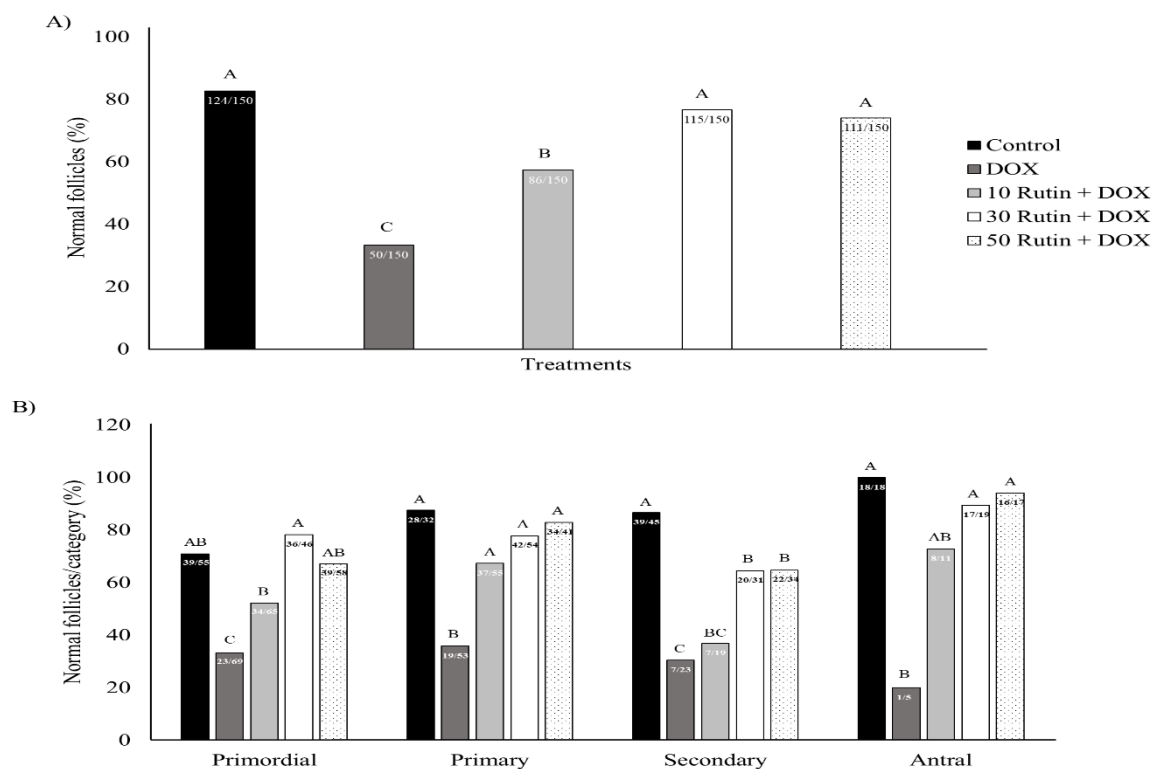
**Figure 1.** Histological sections of mouse ovarian fragments in the control group (A); note the normal centrally located oocytes surrounded by well-organized granulosa cells, and well-preserved ovarian stroma (B, zoom of A); exposed to doxorubicin alone (C); note the vacuolated oocyte surrounded by disorganized granulosa cells (D, zoom of C); or exposed to 30 mg/kg rutin plus doxorubicin (E); note the normal oocyte surrounded by normal granulosa cells (F, zoom of E). O: oocyte; GC: granulosa cells; Scale bars: 50  $\mu$ m (A, C, E: 100x; B, D, F: 400x).





Doxorubicin treatment showed fewer normal follicles (33.33%) than those of the control (82.67%) group ( $P < 0.05$ ; Figure 2A). Treatment with 10, 30 or 50 mg/kg rutin (57.33%, 76.67% and 74% of normal follicles, respectively) prevented ( $P < 0.05$ ) the reduction in the percentage of normal follicles induced by doxorubicin, but only 30 and 50 mg/kg rutin maintained this percentage similar ( $P > 0.05$ ) to control group. To verify if any follicular category is more susceptible to atresia, the different developmental stages were compared in each treatment. The doxorubicin treatment had significantly fewer normal follicles in all follicular categories than those of the control group or after treatment with 30 and 50 mg/kg rutin. Nevertheless, 30 or 50 mg/kg rutin treatment maintained the percentages of normal primordial, primary and antral follicles similar ( $P > 0.05$ ) to those of the control group, but had significantly less normal secondary follicles compared with the control (Figure 2B). Primordial follicle activation was not observed in any treatment ( $P > 0.05$ ; data not shown).

**Figure 2.** Total follicular survival (percentage of morphologically normal follicles; A), and percentage of morphologically normal follicles in different stages (primordial, primary, secondary, and antral follicles; B), in the control group, mice treated with doxorubicin (DOX) alone, treated with rutin (10, 30 or 50 mg/kg) before doxorubicin. (<sup>A, B, C</sup>) Bars with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

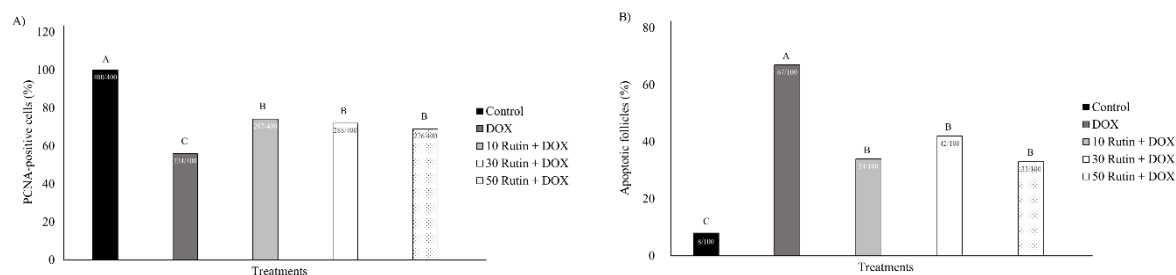


### 3.2. Cell proliferation and apoptosis

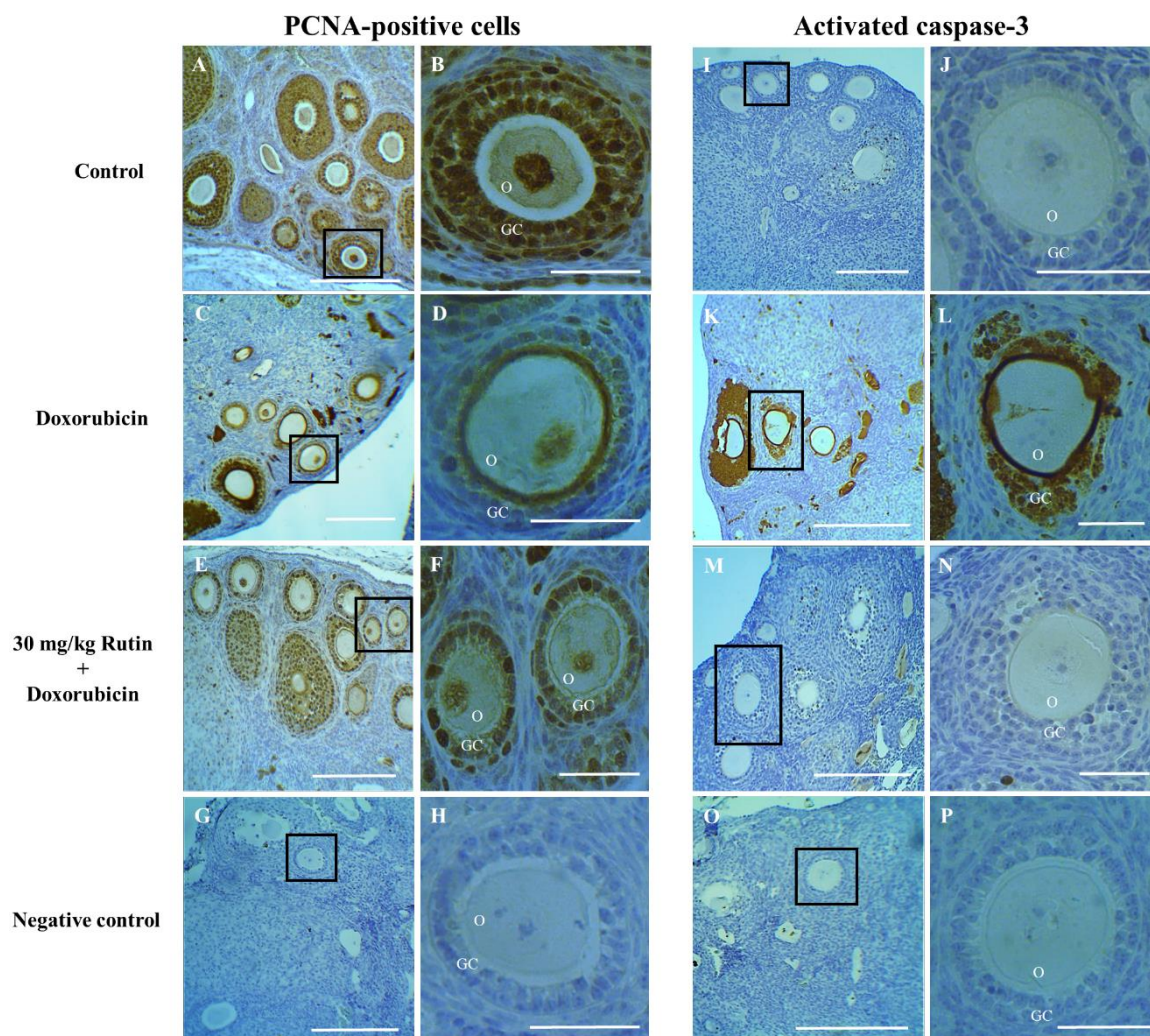
As shown in Figures 3A and 4, follicles of mice from control group (Figures 4A and B) had significantly more PCNA-positive cells than those from doxorubicin (Figure 4C and D) and rutin treatments. Treatment with 10, 30 (Figure 4E and F) or 50 mg/kg rutin ( $P < 0.05$ ) inhibited the reduction of PCNA-positive cells induced by doxorubicin. Negative control did not show staining for immunohistochemical analysis (Figure 4G and H).

Figure 3B shows that the control group (Figure 4I and J) had significantly less apoptotic follicles than doxorubicin (Figure 4K and L) and rutin groups. Moreover, when compared to doxorubicin group, the percentage of apoptotic follicles reduced ( $P < 0.05$ ) with 10, 30 (Figure 4M and N) and 50 mg/kg rutin treatment. Negative control did not show staining for immunohistochemical analysis (Figure 4O and P).

**Figure 3.** Percentage of PCNA-positive cells (A) and percentage of apoptotic follicles (B) in the control group, mice treated with doxorubicin (DOX) alone or treated with rutin (10, 30 or 50 mg/kg) before doxorubicin treatment.



**Figure 4.** Immunohistochemical localization of PCNA-positive cells (A-H) and activated caspase-3 (I-P): follicles in the control group (A and B; I and J), treated with doxorubicin alone (C and D; K and L) or treated with 30 mg/kg rutin plus doxorubicin (E and F; M and N), and negative control (G and H; O and P). O: oocyte; GC: granulosa cells; Scale bars: 50  $\mu$ m (A, C, E, G, I, K, M, O: 100x; B, D, F, H, J, L, N, P: 400x).

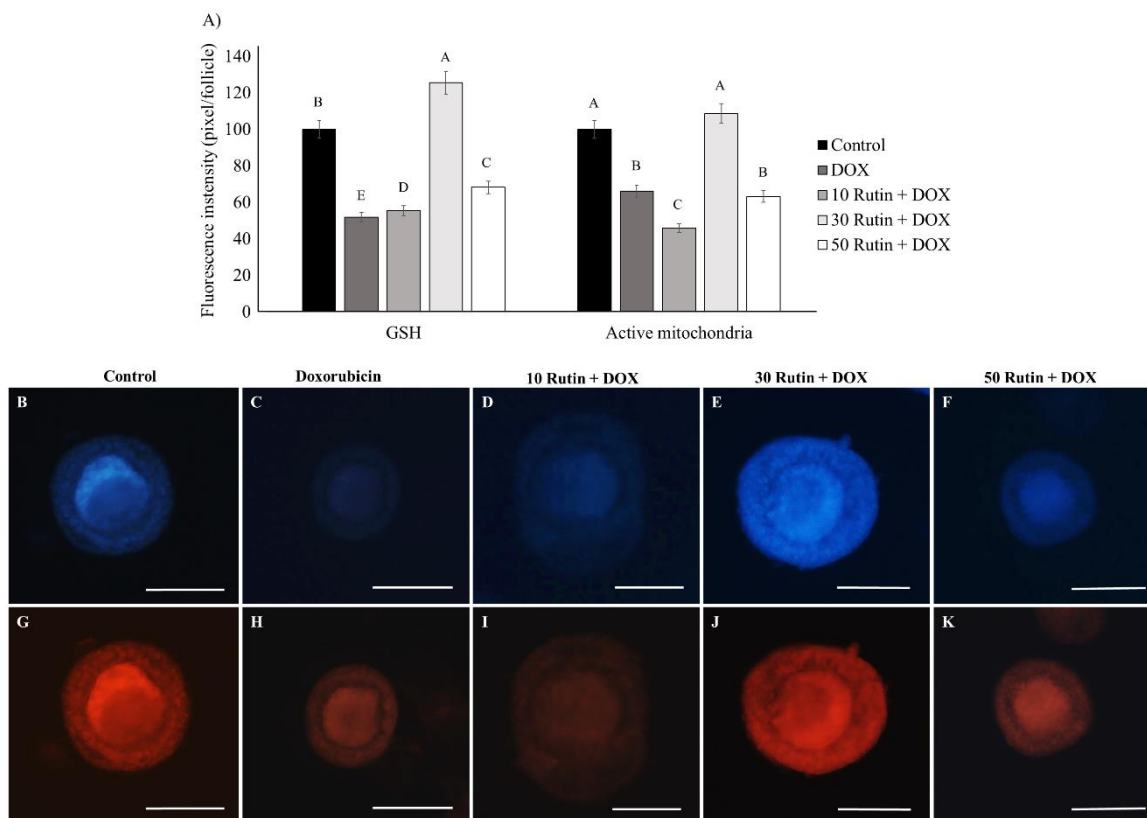


### 3.3. Intracellular levels of reactive oxygen species, glutathione, and mitochondrial activity

Figure 5 shows that doxorubicin treatment decreased ( $P < 0.05$ ) GSH levels and mitochondrial activity compared to the control group. All these changes induced by

doxorubicin were prevented ( $P < 0.05$ ) by 30 mg/kg rutin treatment. In addition, 30 mg/kg rutin treatment increased GSH levels compared to all groups ( $P < 0.05$ ) and showed mitochondrial activity levels similar ( $P > 0.05$ ) to those observed in the control group.

**Figure 5.** Intracellular levels of GSH and active mitochondria (A) in follicles of different groups exposed or not to doxorubicin (DOX) alone or in association with rutin (10, 30 or 50 mg/kg). (A, B, C, D, E) Within each group (GSH or active mitochondria), bars with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). Detection of intracellular levels of GSH and mitochondrial function (B-K): follicles in the control (B, G), treated with doxorubicin alone (C, H), treated with 10 mg/kg (D, I), 30 mg/kg (E, J) or 50 mg/kg (F, K) rutin plus doxorubicin. Scale bars: 50  $\mu\text{m}$  (100x).



#### 4. Discussion

This study demonstrated for the first time that treatment with rutin attenuated doxorubicin-induced damage to the mouse ovary. Rutin is a phytochemical from dietary and

medicinal plants that exhibits several bioactive properties, and can be used in drugs for the prevention of disease (Farha *et al.*, 2020; Li and Yang, 2020; Nouri *et al.*, 2020).

In this study, treatment with 30 mg/kg rutin before and after doxorubicin administration showed more normal follicles and less apoptosis, and increased cell proliferation, GSH levels and mitochondrial activity compared to doxorubicin treatment alone. Our results are promising because rutin maintained a greater number of normal follicles (76.67%) than resveratrol (62.14%) and protocatechuic acid (70.80%) when associated with chemotherapy treatment with cisplatin (Said, Mantawy and El-Demerdash, 2019; Gouveia *et al.*, 2020). In a study conducted by our group, rutin preserved follicle survival and cell proliferation, reduced apoptosis and ROS levels and increased active mitochondria and GSH levels when associated with chemotherapy treatment with cisplatin (Lins *et al.*, 2020). Moreover, rutin decreased apoptosis in the mouse testes submitted to treatment with antineoplastic idarubicin (Deihimi *et al.*, 2017). In rats, rutin ameliorated the ovarian injury and testicular damage caused by antineoplastic busulfan or titanium dioxide decreasing levels of the lipid peroxidation marker malondialdehyde (MDA) and increasing GSH levels and testosterone (Hussein *et al.*, 2019; Abarikwu, Mgbudom-Okah and Onuah, 2020). Additionally, treatment with rutin inhibited mitochondrial dysfunction in pig kidneys (Qu *et al.*, 2019), increased mitochondrial oxidative phosphorylation in mice neurons (Pan *et al.*, 2020), and increased gene expression related to mitochondrial biogenesis, such as nuclear respiratory factor (NRF), transcription factor A (Tfam), sirtuin1 (SIRT1), decreasing adiposity, increasing energy expenditure, and improving glucose homeostasis in both genetically obese and diet-induced obesity mice (Yuan *et al.*, 2017). Therefore, we suggested that 30 mg/kg rutin attenuated doxorubicin-induced ovarian damage possibly through its action on mitochondria, consequently preventing oxidative stress (increasing GSH levels) and follicular death by apoptosis. Nevertheless, in the present study, treatment with 10 or 50 mg/kg rutin before and after doxorubicin administration did not increase mitochondrial activity. Thus, we believed that these concentrations were not as efficient or ideal as that of 30 mg/kg rutin to exerts cytoprotective effects in the ovary.

In this study, follicular activation was not observed, which leads us to suggest that the loss of primordial follicles caused by doxorubicin occurred directly by apoptosis, i.e, through the DNA damage of the oocytes in these follicles, and indirectly by increasing apoptosis and decreasing cell proliferation in ovarian stromal tissue, consequently causing a decrease in follicular support (Wang *et al.*, 2019; Lopes *et al.*, 2020).

In conclusion, rutin at 30 mg/kg is efficient to protect mouse ovarian follicles during experimental treatment with doxorubicin. Rutin maintained mitochondrial activity, which consequently prevented oxidative stress by increasing GSH levels and follicular death by apoptosis, and also contributed to cell proliferation. It is important to emphasize that this is only one of the several experimental models that can induce ovarian injury and its conclusion may not be used directly to human and clinical usage without further studies. Additionally, it should be evaluated whether from ovarian tissue culture you would get the same results as those obtained after *in vivo* injection.

### **Funding**

T.L.B.G. Lins holds a scholarship from the Foundation for the Support of Science and Technology of Pernambuco (FACEPE, Brazil). M.H.T. Matos is supported by a grant from National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil).

### **Author contributions**

T.L.B.G.Lins, R.C.Palheta Jr and M.H.T.Matos, conceived and designed research; T.L.B.G.Lins, R.S.Barberino, R.L.S.Silva, A.P.O.Monte, and D.S.P.Campinho, carried out the experiments; T.L.B.G.Lins performed data analysis; T.L.B.G.Lins drafted the manuscript; R.S.Barberino, R.L.S.Silva, A.P.O.Monte, D.S.P.Campinho, R.C.Palheta Jr and M.H.T.Matos revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### **Declaration of competing interest**

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

### **Conflict of interest**

None of the authors has any conflict of interest to declare.

## References

- Abarikwu, S. O., Mgbudom-Okah, C. J. and Onuah, C. L. (2020) 'The protective effect of rutin against busulfan-induced testicular damage in adult rats', *Drug and Chemical Toxicology*. Taylor & Francis, 0(0), pp. 1–9. doi: 10.1080/01480545.2020.1803905.
- Al-Harbi, N. O. *et al.* (2019) 'Rutin inhibits carfilzomib-induced oxidative stress and inflammation via the NOS-mediated NF- $\kappa$ B signaling pathway', *Inflammopharmacology*. Springer International Publishing, 27(4), pp. 817–827. doi: 10.1007/s10787-018-0550-5.
- Caglayan, C. *et al.* (2019) 'Rutin protects mercuric chloride-induced nephrotoxicity via targeting of aquaporin 1 level, oxidative stress, apoptosis and inflammation in rats', *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. Elsevier, 54(April), pp. 69–78. doi: 10.1016/j.jtemb.2019.04.007.
- Deihimi, M. *et al.* (2017) 'The effects of rutin on the gene expression of dazl, bcl2, and caspase3 in Idarubicin-Induced testicular damages in mice', *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 19(4). doi: 10.5812/ircmj.44765.
- Desmeules, P. and Devine, P. J. (2006) 'Characterizing the ovotoxicity of cyclophosphamide metabolites on cultured mouse ovaries', *Toxicological Sciences*, 90(2), pp. 500–509. doi: 10.1093/toxsci/kfj086.
- Ding, Z. M. *et al.* (2019) 'Doxorubicin Exposure Affects Oocyte Meiotic Maturation through DNA Damage-Induced Meiotic Arrest', *Toxicological Sciences*, 171(2), pp. 359–368. doi: 10.1093/toxsci/kfz161.
- Erkan, H. *et al.* (2020) 'Effect of rutin on oxidative and proinflammatory damage induced by cisplatin in blood serum, ureter, bladder and urethra in rats', *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. Taylor & Francis, 34(1), pp. 171–181. doi: 10.1080/13102818.2020.1727362.
- Farha, A. K. *et al.* (2020) 'The anticancer potential of the dietary polyphenol rutin: Current status, challenges, and perspectives', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Taylor & Francis, 0(0), pp. 1–28. doi: 10.1080/10408398.2020.1829541.
- Gouveia, B. B. *et al.* (2020) 'Involvement of PTEN and FOXO3a Proteins in the Protective



Activity of Protocatechuic Acid Against Cisplatin-Induced Ovarian Toxicity in Mice', *Reproductive Sciences*. doi: 10.1007/s43032-020-00305-4.

Hussein, M. M. A. *et al.* (2019) 'Amelioration of titanium dioxide nanoparticle reprotoxicity by the antioxidants morin and rutin', *Environmental Science and Pollution Research*. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(28), pp. 29074–29084. doi: 10.1007/s11356-019-06091-0.

Jin, X. *et al.* (2019) 'Doxorubicin combined with betulinic acid or lonidamine in RGD ligand-targeted pH-sensitive micellar system for ovarian cancer treatment', *International Journal of Pharmaceutics*. Elsevier B.V., 571, p. 118751. doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.118751.

Li, B. and Yang, X. (2020) 'Rutin-loaded cellulose acetate/poly(ethylene oxide) fiber membrane fabricated by electrospinning: A bioactive material', *Materials Science and Engineering C*. Elsevier B.V, 109, p. 110601. doi: 10.1016/j.msec.2019.110601.

Lins, T. L. B. G. *et al.* (2020) 'Rutin prevents cisplatin-induced ovarian damage via antioxidant activity and regulation of PTEN and FOXO3a phosphorylation in mouse model', *Reproductive Toxicology*. doi: 10.1016/j.reprotox.2020.10.001.

Lopes, F. *et al.* (2020) 'Single and combined effects of cisplatin and doxorubicin on the human and mouse ovary in vitro', *Reproduction*, 159(2), pp. 193–204. doi: 10.1530/REP-19-0279.

Nishi, K. *et al.* (2018) 'Doxorubicin-induced female reproductive toxicity: an assessment of ovarian follicular apoptosis, cyclicity and reproductive tissue histology in Wistar rats', *Drug and Chemical Toxicology*, 41(1), pp. 72–81. doi: 10.1080/01480545.2017.1307851.

Nouri, Z. *et al.* (2020) *Targeting multiple signaling pathways in cancer: The rutin therapeutic approach*, *Cancers*. doi: 10.3390/cancers12082276.

Pan, R. Y. *et al.* (2020) 'Sodium rutin ameliorates Alzheimer's disease-like pathology by enhancing microglial amyloid- $\beta$  clearance', *Science Advances*, 5(2), pp. 1–16. doi: 10.1126/SCIADV.AAU6328.

Pedersen, T. and Peters, H. (1968) 'Proposal for a classification of oocytes and follicles in



- the mouse ovary.’, *Journal of reproduction and fertility*, 17(3), pp. 555–557. doi: 10.1530/jrf.0.0170555.
- Qu, S. *et al.* (2019) ‘Rutin attenuates vancomycin-induced renal tubular cell apoptosis via suppression of apoptosis, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress’, *Phytotherapy Research*, 33(8), pp. 2056–2063. doi: 10.1002/ptr.6391.
- Ramalingayya, G. V. *et al.* (2019) ‘Rutin Protects against Doxorubicin-Induced Cognitive Dysfunction While Retaining the Anticancer Potential of Dox in a Murine Model of N-Methyl-N-Nitrosourea - Induced Mammary Carcinoma’, *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 38(2), pp. 153–163. doi: 10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2019028294.
- Said, R. S., Mantawy, E. M. and El-Demerdash, E. (2019) ‘Mechanistic perspective of protective effects of resveratrol against cisplatin-induced ovarian injury in rats: emphasis on anti-inflammatory and anti-apoptotic effects’, *Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology*. *Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology*, 392(10), pp. 1225–1238. doi: 10.1007/s00210-019-01662-x.
- Salem, E. A., Salem, N. A. and Hellstrom, W. J. (2017) ‘Therapeutic effect of ozone and rutin on adriamycin-induced testicular toxicity in an experimental rat model’, *Andrologia*, 49(1). doi: 10.1111/and.12603.
- Samare-Najaf, M., Zal, F. and Safari, S. (2020) ‘Primary and Secondary Markers of Doxorubicin-Induced Female Infertility and the Alleviative Properties of Quercetin and Vitamin E in a Rat Model’, *Reproductive Toxicology*. Elsevier Inc., 96(July), pp. 316–326. doi: 10.1016/j.reprotox.2020.07.015.
- Spears, N. *et al.* (2019) ‘Ovarian damage from chemotherapy and current approaches to its protection’, *Human Reproduction Update*, 25(6), pp. 673–693. doi: 10.1093/humupd/dmz027.
- Szymanska, K. J., Tan, X. and Oktay, K. (2020) ‘Unraveling the mechanisms of chemotherapy-induced damage to human primordial follicle reserve: road to developing therapeutics for fertility preservation and reversing ovarian aging’, *Molecular Human Reproduction*. doi: 10.1093/molehr/gaaa043.
- Wang, Y. *et al.* (2019) ‘Doxorubicin obliterates mouse ovarian reserve through both

primordial follicle atresia and overactivation', *Toxicology and Applied Pharmacology*. Elsevier, 381(July), p. 114714. doi: 10.1016/j.taap.2019.114714.

Xiao, S. *et al.* (2017) 'Doxorubicin has dose-dependent toxicity on mouse ovarian follicle development, hormone secretion, and oocyte maturation', *Toxicological Sciences*, 157(2), pp. 320–329. doi: 10.1093/toxsci/kfx047.

Yaşar, H. *et al.* (2019) 'Peripheral neurotoxic effects of cisplatin on rats and treatment with rutin', *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 28(11), pp. 1537–1543.

Yuan, X. *et al.* (2017) 'Rutin ameliorates obesity through brown fat activation', *FASEB Journal*, 31(1), pp. 333–345. doi: 10.1096/fj.201600459RR.

Zhang, T. *et al.* (2017) 'Effect of doxorubicin-induced ovarian toxicity on mouse ovarian granulosa cells', *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. Elsevier Ltd, 86, pp. 1–10. doi: 10.1016/j.yrtph.2017.02.012.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta tese demonstrou que 1 µg/mL de rutina, adicionada ao meio de cultivo de tecido ovariano ovino, promove ativação e crescimento folicular e diminui a apoptose, bem como o tratamento com 10 ou 30 mg/Kg de rutina preveniu os danos ovarianos causados pela cisplatina ou doxorrubicina, respectivamente, mantendo a percentagem de folículos normais, proliferação celular, reduzindo a apoptose e níveis de ERO, com o aumento nos níveis de GSH e atividade mitocondrial pela modulação da via PI3K, através das proteínas AKT, PTEN e FOXO3a.

Tendo em vista que a rutina proporciona uma praticidade na preparação de formulações específicas, o seu uso em meios de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos, poderia ajudar na formulação de um meio de cultivo ideal para essa espécie.

Além disso, medicamentos que tenham como base a rutina poderiam ser desenvolvidos para preservar a função ovariana durante a quimioterapia. Entretanto, ressalta-se que os estudos desenvolvidos neste trabalho foram realizados com animais saudáveis. Desta forma, mais estudos devem ser realizados para avaliar como os antioxidantes atuariam em animais acometidos com câncer, por exemplo, se os antioxidantes iriam interferir ou reduzir a ação antineoplásica da cisplatina ou doxorrubicina.

Mesmo que alguns marcadores associados à toxicidade tenham sido avaliados neste trabalho, os estudos biológicos necessários (estudar outras vias envolvidas, tratamento crônico, a ação direta das substâncias sobre as células *in vitro*, etc.) podem ser realizados de acordo com a finalidade e a direção de experimentos futuros. Finalmente, apesar dos resultados positivos obtidos nesta tese, é preciso cautela para aplicar essas descobertas diretamente em seres humanos, sendo necessários estudos adicionais para uso clínico nesta espécie.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARIKWU, S. O. et al. Rutin ameliorates cyclophosphamide-induced reproductive toxicity in male rats. **Toxicology International**, v. 19, n. 2, p. 207–214, 2012.

ABARIKWU, S. O.; MGBUDOM-OKAH, C. J.; ONUAH, C. L. The protective effect of rutin against busulfan-induced testicular damage in adult rats. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 0, n. 0, p. 1–9, 2020.

ABDOLLAHI, F. S. et al. Effect of Phoenix dactylifera pollen grain on maturation of preantral follicles in NMRI mice. **Journal of HerbMed Pharmacology**, v. 4, n. 3, p. 93–97, 2015.

ADHIKARI, D. et al. Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. **Human Molecular Genetics**, v. 19, n. 3, p. 397–410, 2010.

ADHIKARI, D. et al. Pharmacological Inhibition of mTORC1 Prevents Over-Activation of the Primordial Follicle Pool in Response to Elevated PI3K Signaling. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.

AERTS, J. M. J.; BOLS, P. E. J. Ovarian follicular dynamics. A review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 1, p. 180–187, 2010.

AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. The flavonoids, myricetin, quercetin and rutin, protect against cholestan-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol- induced toxicity in Chinese hamster ovary cells in vitro. **Nutrition Research**, v. 19, n. 5, p. 749–760, 1999.

AKASHA, A. M.; WOODRUFF, T. K. Oncofertility: Preservation of Ovarian Function After a Cancer Diagnosis. In: **The Ovary**. [s.l: s.n.]. p. 501–508.

AKONDI, B. R.; CHALLA, S. R.; AKULA, A. Protective effects of rutin and naringin in testicular ischemia- reperfusion induced oxidative stress in rats. **Journal of Reproduction and Infertility**, v. 12, n. 3, p. 209–214, 2011.

AKONDI, R. B. et al. Protective effect of rutin and naringin on sperm quality in streptozotocin (STZ) induced type 1 diabetic rats. **Iranian Journal of Pharmaceutical**

**Research**, v. 10, n. 3, p. 585–596, 2011.

AKSU, E. H. et al. Rutin ameliorates cisplatin-induced reproductive damage via suppression of oxidative stress and apoptosis in adult male rats. **Andrologia**, v. 49, n. 1, 2017.

AL-HARBI, N. O. et al. Rutin inhibits carfilzomib-induced oxidative stress and inflammation via the NOS-mediated NF- $\kappa$ B signaling pathway. **Inflammopharmacology**, v. 27, n. 4, p. 817–827, 2019.

ALAM, M. H.; MIYANO, T. Interaction between growing oocytes and granulosa cells in vitro. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 19, n. 1, p. 13–23, 2020.

ALGARROBA, G. N.; SANFILIPPO, J. S.; VALLI-PULASKI, H. Female fertility preservation in the pediatric and adolescent cancer patient population. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 48, p. 147–157, 2018a.

ALGARROBA, G. N.; SANFILIPPO, J. S.; VALLI-PULASKI, H. Female fertility preservation in the pediatric and adolescent cancer patient population. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 48, p. 147–157, 2018b.

ALMUTAIRI, M. M. et al. Neuro-protective effect of rutin against Cisplatin-induced neurotoxic rat model. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 1–9, 2017.

AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B. **Natural antioxidants of plant origin**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

AMBEKAR, A. S. et al. Proteomic analysis of human follicular fluid: A new perspective towards understanding folliculogenesis. **Journal of Proteomics**, v. 87, p. 68–77, 2013.

ANAND, H. et al. Protective effects of Eugenia jambolana extract versus N-acetyl cysteine against cisplatin-induced damage in rat testis. **Andrologia**, v. 47, n. 2, p. 194–208, 2015.

ANDRADE, G. M. et al. The role of the PI3K-Akt signaling pathway in the developmental competence of bovine oocytes. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, 2017.

ANDRADE, G. M. et al. Intrafollicular barriers and cellular interactions during ovarian follicle development. **Animal Reproduction**, v. 16, n. 3, p. 485–496, 2019.

ATANASSOVA, M.; BAGDASSARIAN, V. Rutin Content in Plant Products. **Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy**, v. 44, n. 2, p. 201–203, 2009.

BARBERINO, R. S. et al. Melatonin protects against cisplatin-induced ovarian damage in mice via the MT1 receptor and antioxidant activity. **Biology of Reproduction**, v. 96, n. 6, p. 1244–1255, 2017.

BARBERINO, R. S. et al. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces apoptosis of preantral follicles through the phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) signaling pathway after in vitro culture of sheep ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 155, p. 25–32, 2020.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113–123, 2006.

BEATTIE, D. S. Bioenergética e metabolismo oxidativo. In: **Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas**. 6<sup>a</sup> ed ed. São Paulo: [s.n.]. p. 521–568.

BERTOLDO, M. J. et al. In-vitro regulation of primordial follicle activation: challenges for fertility preservation strategies. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 36, n. 5, p. 491–499, 2018.

BEZERRA, M. É. S. et al. Resveratrol promotes in vitro activation of ovine primordial follicles by reducing DNA damage and enhancing granulosa cell proliferation via phosphatidylinositol 3-kinase pathway. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n. 6, p. 1298–1305, 2018.

BILDIK, G. et al. C-Abl is not activated in DNA damage-induced and Tap63-mediated oocyte apoptosis in human ovary. **Cell Death and Disease**, v. 9, n. 10, 2018.

BLACK, R. A. et al. metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells. **Nature**, v. 385, p. 729–733, 1997.

BONECHI, C. et al. Protective effect of quercetin and rutin encapsulated liposomes on induced oxidative stress. **Biophysical Chemistry**, v. 233, n. August 2017, p. 55–63, 2018.

BOUROGAA, E. et al. Hammada scoparia flavonoids and rutin kill adherent and chemoresistant leukemic cells. **Leukemia Research**, v. 35, n. 8, p. 1093–1101, 2011.

BOYLE, S. P. et al. Bioavailability and efficiency of rutin as an antioxidant: A human supplementation study. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 54, n. 10, p. 774–782, 2000.

BRADLEY, J.; SWANN, K. Mitochondria and lipid metabolism in mammalian oocytes and early embryos. **International Journal of Developmental Biology**, v. 63, n. 3–5, p. 93–103, 2019.

BROMFIELD, J. J.; SHELDON, I. M. Lipopolysaccharide reduces the primordial follicle pool in the bovine ovarian cortex ex vivo and in the murine ovary in vivo. **Biology of Reproduction**, v. 88, n. 4, 2013.

BUS, A. et al. Is the pre-antral ovarian follicle the ‘holy grail’ for female fertility preservation? **Animal Reproduction Science**, v. 207, n. May, p. 119–130, 2019.

BUSHAU-SPRINKLE, A. et al. Loss of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchange Regulatory Factor 1 Increases Susceptibility to Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury. **American Journal of Pathology**, v. 189, n. 6, p. 1190–1200, 2019.

CAGLAYAN, C. et al. Rutin protects mercuric chloride-induced nephrotoxicity via targeting of aquaporin 1 level, oxidative stress, apoptosis and inflammation in rats. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 54, n. April, p. 69–78, 2019.

CAI, W. et al. ESI-TOF MS analysis and DNA cleavage activity of rutin-metal complexes in aqueous extracts of medicinal plants. **Inorganic Chemistry Frontiers**, v. 6, n. 11, p. 3184–3195, 2019.

CALZADA, F. et al. Antilymphoma potential of the ethanol extract and rutin obtained of the leaves from schinus molle linn. **Pharmacognosy Research**, v. 10, n. 2, p. 119–123, 2018.

CAO, Y. et al. Tumor Platinum Concentrations and Pathological Responses Following Cisplatin-Containing Chemotherapy in Gastric Cancer Patients. **Journal of Gastrointestinal Cancer**, v. 50, n. 4, p. 801–807, 2019.

CARVALHO, T. T. et al. The granulopoietic cytokine granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) induces pain: analgesia by rutin. **Inflammopharmacology**, v. 27, n. 6, p. 1285–1296, 2019.

- CASSIDY, A. et al. Habitual intake of flavonoid subclasses and incident hypertension in adults. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 93, n. 2, p. 338–347, 2011.
- CECCONI, S. et al. The role of Akt signalling in the mammalian ovary. **International Journal of Developmental Biology**, v. 56, n. 10–12, p. 809–817, 2012.
- CHAN, J. L.; WANG, E. T. Oncofertility for women with gynecologic malignancies. **Gynecologic Oncology**, v. 144, n. 3, p. 631–636, 2017.
- CHAN, S. H. et al. SIRT1 inhibition causes oxidative stress and inflammation in patients with coronary artery disease. **Redox Biology**, v. 13, p. 301–309, 2017.
- CHANG, E. M. et al. Cisplatin induces overactivation of the dormant primordial follicle through PTEN/AKT/FOXO3 $\alpha$  pathway which leads to loss of ovarian reserve in mice. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, 2015.
- CHAUDHARY, G. R. et al. Necrosis and necroptosis in germ cell depletion from mammalian ovary. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 6, p. 8019–8027, 2018.
- CHAUDHARY, G. R. et al. Necroptosis in stressed ovary. **Journal of Biomedical Science**, v. 26, n. 1, p. 1–6, 2019.
- CHEN, I. L. et al. Lymphatic absorption of quercetin and rutin in rat and their pharmacokinetics in systemic plasma. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 1, p. 546–551, 2010.
- CHEN, Y. et al. Collateral damage in cancer chemotherapy: Oxidative stress in nontargeted tissues. **Molecular Interventions**, v. 7, n. 3, p. 147–156, 2007.
- CHIEN, Y.; ROSAL, K.; CHUNG, B. CHU. Function of CYP11A1 in the mitochondria. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 441, p. 55–61, 2017.
- CHINWE, G. S.; AZUKA, O. I.; ADAEZE, N. C. Resveratrol supplementation rescues pool of growing follicles and ovarian stroma from Cisplatin-induced toxicity on the ovary in Sprague-Dawley rats: An experimental study. **International Journal of Reproductive BioMedicine**, v. 16, n. 1, p. 19–30, 2018.
- CHOI, J. et al. Induction of apoptotic cell death via accumulation of autophagosomes in rat granulosa cells. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 4, p. 1482–1486, 2011.



CIARIMBOLI, G. Membrane transporters as mediators of cisplatin side-effects.

**Anticancer Research**, v. 34, n. 1, p. 547–550, 2014.

CLARKE, H. Control of mammalian oocyte development by interactions with the maternal follicular environment. **Results and Problems in Cell Differentiation**, v. 63, p. 17–41, 2017.

COBANOGLU, H. B. et al. Is hyperbaric oxygen therapy effective in cisplatin-induced ototoxicity in rats? **Clinical and Experimental Otorhinolaryngology**, v. 12, n. 1, p. 66–71, 2019.

CZABOTAR, P. E. et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: Implications for physiology and therapy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 1, p. 49–63, 2014.

DASARI, S.; BERNARD TCHOUNWOU, P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**, v. 740, p. 364–378, 2014.

DEEPIKA, M. S. et al. A novel rutin-fucoidan complex based phytotherapy for cervical cancer through achieving enhanced bioavailability and cancer cell apoptosis. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 109, n. October 2018, p. 1181–1195, 2019.

DEIHIMI, M. et al. The effects of rutin on the gene expression of dazl, bcl2, and caspase3 in Idarubicin-Induced testicular damages in mice. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v. 19, n. 4, 2017.

DESMEULES, P.; DEVINE, P. J. Characterizing the ovotoxicity of cyclophosphamide metabolites on cultured mouse ovaries. **Toxicological Sciences**, v. 90, n. 2, p. 500–509, 2006.

DILRUBA, S.; KALAYDA, G. V. Platinum-based drugs: past, present and future. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 77, p. 1103–1124, 2016.

DING, Z. M. et al. Doxorubicin Exposure Affects Oocyte Meiotic Maturation through DNA Damage-Induced Meiotic Arrest. **Toxicological Sciences**, v. 171, n. 2, p. 359–368, 2019.

DRIANCOURT, M. A. Follicular dynamics in sheep and cattle. **Theriogenology**, v. 35, n. 1, p. 55–79, 1991.

DUNLOP, E. A.; TEE, A. R. mTOR and autophagy: A dynamic relationship governed by nutrients and energy. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 36, p. 121–129, 2014.

EL-HAYEK, S.; CLARKE, H. J. Control of oocyte growth and development by intercellular communication within the follicular niche. In: **Results and Problems in Cell Differentiation**. [s.l: s.n.]. v. 58p. 191–224.

EPPIG, J. J.; SCHROEDER, A. C. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 41, n. 2, p. 268–276, 1989.

ERKAN, H. et al. Effect of rutin on oxidative and proinflammatory damage induced by cisplatin in blood serum, ureter, bladder and urethra in rats. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 34, n. 1, p. 171–181, 2020.

ERLUND, I. et al. Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 56, n. 8, p. 545–553, 2000.

FARHA, A. K. et al. The anticancer potential of the dietary polyphenol rutin: Current status, challenges, and perspectives. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 0, n. 0, p. 1–28, 2020.

FEI, J. et al. Low concentration of rutin treatment might alleviate the cardiotoxicity effect of pirarubicin on cardiomyocytes via activation of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. **Bioscience Reports**, v. 39, n. 6, p. 1–14, 2019.

FELICE, F. et al. Fertility preservation in gynaecologic cancers. **Ecancermedicalsecience**, v. 12, p. 1–11, 2018.

FENG, R. Z. et al. Extraction and antioxidant activity of flavonoids of *Morus nigra*. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 12, p. 22328–22336, 2015.

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; SILVA, J. R. V. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. [s.l: s.n.]. p. 303–327.

FIGUEIREDO, J. R. DE; LIMA, L. F. DE. Tecnologia do ovário artificial: aplicações, estado da arte, limitações e perspectivas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p. 248–253, 2017.

FIGUEIREDO, J. R. et al. Control of growth and development of preantral follicle: Insights from in vitro culture. **Animal Reproduction**, v. 15, n. Irrs, p. 648–659, 2018.

FIGUEIREDO, J. R. et al. Advances in in vitro folliculogenesis in domestic ruminants. **Animal Reproduction**, v. 16, n. 1, p. 52–65, 2019.

FINDLAY, J. K. et al. **Follicle Selection in Mammalian Ovaries**. 3. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

FREITAS, C. et al. Follicular Fluid redox involvement for ovarian follicle growth. **Journal of Ovarian Research**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2017.

FUJIHARA, M. et al. Epidermal growth factor (EGF) sustains in vitro primordial follicle viability by enhancing stromal cell proliferation via mapk and PI3K pathways in the prepubertal, but not adult, cat ovary. **Biology of Reproduction**, v. 90, n. 4, 2014.

GALATI, G.; O'BRIEN, P. J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 3, p. 287–303, 2004.

GANESHPURKAR, A.; SALUJA, A. K. The Pharmacological Potential of Rutin. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 25, n. 2, p. 149–164, 2017.

GANGA RAJU M; PREM PRASAD GOUD; SUVARCHALA REDDY NVL. Antihypertensive Effect of Rutin: Pharmacological and Computational Approach. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 12, n. 8, p. 87–92, 2019.

GAO, W. et al. The Protective Effect of N-Acetylcysteine on Ionizing Radiation Induced Ovarian Failure and Loss of Ovarian Reserve in Female Mouse. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.

GATELY, D. P.; HOWELL, S. B. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: A review. **British Journal of Cancer**, v. 67, n. 6, p. 1171–1176, 1993.

GEÇOTEK, A. et al. Rutin and ascorbic acid cooperation in antioxidant and antiapoptotic

effect on human skin keratinocytes and fibroblasts exposed to UVA and UVB radiation. **Archives of Dermatological Research**, v. 311, n. 3, p. 203–219, 2019.

GEŃGOTEK, A.; RYBAŁTOWSKA-KAWAŁKO, P.; SKRZYDLEWSKA, E. Rutin as a Mediator of Lipid Metabolism and Cellular Signaling Pathways Interactions in Fibroblasts Altered by UVA and UVB Radiation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.

GHORBANI, A. Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 96, p. 305–312, 2017.

GHOSH, S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. **Bioorganic Chemistry**, v. 88, 2019a.

GHOSH, S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. **Bioorganic Chemistry**, v. 88, n. October 2018, p. 102925, 2019b.

GOUGEON, A. Human ovarian follicular development: From activation of resting follicles to preovulatory maturation. **Annales d'Endocrinologie**, v. 71, n. 3, p. 132–143, 2010.

GOUVEIA, B. B. et al. DNA damage and primordial follicle activation after in vitro culture of sheep ovarian cortex in *Morus nigra* leaf extract. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 39, n. 1, p. 85–92, 2019.

GOUVEIA, B. B. et al. Involvement of PTEN and FOXO3a Proteins in the Protective Activity of Protocatechuic Acid Against Cisplatin-Induced Ovarian Toxicity in Mice. **Reproductive Sciences**, 2020.

GRABOSCH, S. et al. Cisplatin-induced immune modulation in ovarian cancer mouse models with distinct inflammation profiles. **Oncogene**, v. 38, n. 13, p. 2380–2393, 2019.

GRANADOS-APARICI, S. et al. SMAD3 directly regulates cell cycle genes to maintain arrest in granulosa cells of mouse primordial follicles. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancrologia**, v. 53, n. 3, p. 335–343, 2007.

GUERREIRO, D. D. et al. In situ cultured preantral follicles is a useful model to evaluate

- the effect of anticancer drugs on caprine folliculogenesis. **Microscopy research and technique**, v. 79, n. 8, p. 773–781, 2016.
- GUERREIRO, D. D. et al. In vitro culture systems as an alternative for female reproductive toxicology studies. **Zygote**, v. 27, n. 2, p. 55–63, 2019.
- GUERREIRO, D. D. et al. Response of preantral follicles exposed to quinoxaline: A new compound with anticancer potential. **Research in Veterinary Science**, v. 128, n. December 2019, p. 261–268, 2020.
- GULLÓN, B. et al. Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability. **Trends in Food Science and Technology**, v. 67, p. 220–235, 2017.
- HADIGOL, T. et al. The Effect of Rutin on Progesterone and Estrogen Receptor Expression in Uterine Endometrial Tissue in the Heterotopic Transplantation of Newborn Mouse Ovary. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v. 21, n. 4, 2019.
- HAN, S. Y. et al. Effects of rutin from leaves and flowers of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.) on angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and proliferation of fibroblasts. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 1, p. 137–140, 2010.
- HAO, X. et al. Ovarian follicle depletion induced by chemotherapy and the investigational stages of potential fertility-protective treatments-A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 19, 2019.
- HARDY, K. et al. Nuclear exclusion of SMAD2/3 in granulosa cells is associated with primordial follicle activation in the mouse ovary. **Journal of Cell Science**, v. 131, n. 17, 2018.
- HASANEIN, P. et al. Beneficial effects of rutin in diabetes-induced deficits in acquisition learning, retention memory and pain perception in rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 23, n. 7, p. 1–12, 2018.
- HEILIGENTAG, M.; EICHENLAUB-RITTER, U. Preantral follicle culture and oocyte quality. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 30, n. 1, p. 18–43, 2018.
- HILMER, S. N. et al. The hepatic pharmacokinetics of doxorubicin and liposomal

doxorubicin. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 32, n. 8, p. 794–799, 2004.

HIRAO, Y. et al. In Vitro Growth and Development of Bovine Oocyte-Granulosa Cell Complexes on the Flat Substratum: Effects of High Polyvinylpyrrolidone Concentration in Culture Medium. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 1, p. 83–91, 2004.

HU, T. et al. Brown adipose tissue activation by rutin ameliorates polycystic ovary syndrome in rat. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 47, p. 21–28, 2017.

HUANG, R. et al. Rutin alleviates diabetic cardiomyopathy and improves cardiac function in diabetic ApoEknockout mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 814, p. 151–160, 2017.

HUMMITZSCH, K. et al. **Development of the Mammalian Ovary and Follicles**. 3. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

HUSSEIN, M. M. A. et al. Amelioration of titanium dioxide nanoparticle reprotoxicity by the antioxidants morin and rutin. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 28, p. 29074–29084, 2019.

HUTT, K. J.; ALBERTINI, D. F. An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 14, n. 6, p. 758–764, 2007.

IYER, S. et al. FOXOs attenuate bone formation by suppressing Wnt signaling. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 8, p. 3409–3419, 2013.

JAGARLAMUDI, K.; RAJKOVIC, A. Oogenesis: Transcriptional regulators and mouse models. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 356, n. 1–2, p. 31–39, 2012.

JAHAN, S. et al. Ameliorative effects of rutin against metabolic, biochemical and hormonal disturbances in polycystic ovary syndrome in rats. **Journal of Ovarian Research**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2016.

JANG, H. et al. Melatonin prevents cisplatin-induced primordial follicle loss via suppression of PTEN/AKT/FOXO3a pathway activation in the mouse ovary. **Journal of Pineal Research**, v. 60, n. 3, p. 336–347, 2016.

JIN, X. et al. Doxorubicin combined with betulinic acid or lonidamine in RGD ligand-targeted pH-sensitive micellar system for ovarian cancer treatment. **International Journal**

of **Pharmaceutics**, v. 571, p. 118751, 2019a.

JIN, Y. et al. Inhibition of p90RSK activation sensitizes triple-negative breast cancer cells to cisplatin by inhibiting proliferation, migration and EMT. **BMB Reports**, v. 52, n. 12, p. 706–711, 2019b.

JOHN, G. B. et al. Foxo3 is a PI3K-dependent molecular switch controlling the initiation of oocyte growth. **Developmental Biology**, v. 321, n. 1, p. 197–204, 2008.

KALA, M.; SHAIKH, M. V.; NIVSARKAR, M. Equilibrium between anti-oxidants and reactive oxygen species: a requisite for oocyte development and maturation. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 16, n. 1, p. 28–35, 2017.

KALICH-PHILOSOPH, L. et al. Cyclophosphamide triggers follicle activation and "burnout "; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 185, 2013.

KALLEN, A.; POLOTSKY, A. J.; JOHNSON, J. Untapped Reserves: Controlling Primordial Follicle Growth Activation. **Trends in Molecular Medicine**, v. 24, n. 3, p. 319–331, 2018.

KAM, W. W. Y. et al. Predicted ionisation in mitochondria and observed acute changes in the mitochondrial transcriptome after gamma irradiation: A Monte Carlo simulation and quantitative PCR study. **Mitochondrion**, v. 13, n. 6, p. 736–742, 2013.

KARAK, P. Biological Activities of Flavonoids: an Overview. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 10, n. 4, p. 1567, 2019.

KAYGUSUZOGLU, E. et al. Zingerone ameliorates cisplatin-induced ovarian and uterine toxicity via suppression of sex hormone imbalances, oxidative stress, inflammation and apoptosis in female wistar rats. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 102, p. 517–530, 2018.

KIM, S.; KOH, H. Role of FOXO transcription factors in crosstalk between mitochondria and the nucleus. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 49, n. 4, p. 335–341, 2017.

KIM, S. Y. et al. Transient inhibition of p53 homologs protects ovarian function from two distinct apoptotic pathways triggered by anticancer therapies. **Cell Death and**

**Differentiation**, v. 26, n. 3, p. 502–515, 2019.

KRAMMER, P. H. CD95's deadly mission in the immune system. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 789–795, 2000.

KROEMER, G.; MARIÑO, G.; LEVINE, B. Autophagy and the Integrated Stress Response. **Molecular Cell**, v. 40, n. 2, p. 280–293, 2010.

KUSHNIR, M. M. et al. Exploratory study of the association of steroid profiles in stimulated ovarian follicular fluid with outcomes of IVF treatment. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 162, p. 126–133, 2016.

LA ROSA, V. L. et al. Fertility preservation in women affected by gynaecological cancer: The importance of an integrated gynaecological and psychological approach. **Ecancermedicalsecience**, v. 14, p. 1–8, 2020.

LAI, Q. et al. Oxidative stress in granulosa cells contributes to poor oocyte quality and IVF-ET outcomes in women with polycystic ovary syndrome. **Frontiers of Medicine**, v. 12, n. 5, p. 518–524, 2018.

LARSSON, N.-G. Somatic Mitochondrial DNA Mutations in Mammalian Aging. **Annual Review of Biochemistry**, v. 79, n. 1, p. 683–706, 2010.

LAURO, M. R. et al. Fast- and slow-release tablets for oral administration of flavonoids: Rutin and quercetin. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 28, n. 4, p. 371–379, 2002.

LEE, H. N.; CHANG, E. M. Primordial follicle activation as new treatment for primary ovarian insufficiency. **Clinical and Experimental Reproductive Medicine**, v. 46, n. 2, p. 43–49, 2019.

LEESE, H. J. et al. Biological optimization, the Goldilocks principle, and how much is lagom in the preimplantation embryo. **Molecular Reproduction and Development**, v. 83, n. 9, p. 748–754, 2016.

LI, B.; YANG, X. Rutin-loaded cellulose acetate/poly(ethylene oxide) fiber membrane fabricated by electrospinning: A bioactive material. **Materials Science and Engineering C**, v. 109, p. 110601, 2020.



- LI, H.; CHIAN, R. C. Follicular development and oocyte growth. In: **Development of In Vitro Maturation for Human Oocytes: Natural and Mild Approaches to Clinical Infertility Treatment**. [s.l: s.n.]. p. 37–57.
- LI, L. et al. The role of autophagy in cardiac hypertrophy. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 48, n. 6, p. 491–500, 2016.
- LI, Q. et al. ERCC2 helicase domain mutations confer nucleotide excision repair deficiency and drive cisplatin sensitivity in muscle-invasive bladder cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 25, n. 3, p. 977–988, 2019a.
- LI, X. et al. Inhibition of autophagy via activation of PI3K/Akt/mTOR pathway contributes to the protection of hesperidin against myocardial ischemia/reperfusion injury. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 42, n. 4, p. 1917–1924, 2018.
- LI, Y. et al. Rutin prevents retinal ganglion cell death and exerts protective effects by regulating transforming growth factor- $\beta$ 2/smad2/3akt/PTEN signaling in experimental rat glaucoma. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 5, p. 985–993, 2019b.
- LIANG, W. et al. Protective effects of rutin on liver injury in type 2 diabetic db/db mice. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 107, n. August, p. 721–728, 2018.
- LIENOU, L. L. et al. Effect of different extracts and fractions of *Senecio biafrae* (Oliv. & Hiern) J. Moore on in vivo and in vitro parameters of folliculogenesis in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 251, n. November 2019, p. 112571, 2020.
- LIM, E. J.; CHOI, Y. Transcription factors in the maintenance and survival of primordial follicles. **Clinical and Experimental Reproductive Medicine**, v. 39, n. 4, p. 127–131, 2012.
- LIN, Q. et al. Upregulation of SIRT1 contributes to the cardioprotective effect of Rutin against myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 46, p. 227–236, 2018.
- LIN, S. et al. Production of quercetin, kaempferol and their glycosidic derivatives from the aqueous-organic extracted residue of litchi pericarp with *Aspergillus awamori*. **Food Chemistry**, v. 145, p. 220–227, 2014.

- LINS, T. L. B. G. et al. Rutin can replace the use of three other antioxidants in the culture medium, maintaining the viability of sheep isolated secondary follicles. **Theriogenology**, v. 89, p. 263–270, 2017.
- LINS, T. L. B. G. et al. Rutin prevents cisplatin-induced ovarian damage via antioxidant activity and regulation of PTEN and FOXO3a phosphorylation in mouse model. **Reproductive Toxicology**, 2020.
- LIU, H. et al. FOXO3a is involved in the apoptosis of naked oocytes and oocytes of primordial follicles from neonatal rat ovaries. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 381, n. 4, p. 722–727, 2009a.
- LIU, H. et al. FOXO3a is involved in the apoptosis of naked oocytes and oocytes of primordial follicles from neonatal rat ovaries. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 381, n. 4, p. 722–727, 2009b.
- LOPES, F. et al. Single and combined effects of cisplatin and doxorubicin on the human and mouse ovary in vitro. **Reproduction**, v. 159, n. 2, p. 193–204, 2020.
- LOURENÇO, S. C.; MOLDÃO-MARTINS, M.; ALVES, V. D. Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications. **Molecules**, v. 24, n. 22, p. 14–16, 2019.
- LU, J. et al. A novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 16, n. 1, p. 1–18, 2018.
- LV, L. et al. Rutin inhibits coronary heart disease through ERK1/2 and Akt signaling in a porcine model. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 15, n. 1, p. 506–512, 2018.
- MA, Y. et al. Rutin attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity via regulating autophagy and apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1863, n. 8, p. 1904–1911, 2017.
- MAIDARTI, M. et al. Inhibition of PTEN activates bovine non-growing follicles in vitro but increases DNA damage and reduces DNA repair response. **Human Reproduction**, v. 34, n. 2, p. 297–307, 2019.
- MAIDARTI, M.; ANDERSON, R. A.; TELFER, E. E. Crosstalk between PTEN/PI3K/Akt Signalling and DNA Damage in the Oocyte: Implications for Primordial Follicle

Activation, Oocyte Quality and Ageing. **Cells**, v. 9, n. 1, p. 200, 2020.

MAKKER, A.; GOEL, M. M.; MAHDI, A. A. PI3K/PTEN/Akt and TSC/mTOR signaling pathways, ovarian dysfunction, and infertility: an update. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 53, n. 3, p. 103–118, 2014.

MALEK, M. et al. PTEN Regulates PI(3,4)P2 Signaling Downstream of Class I PI3K. **Molecular Cell**, v. 68, n. 3, p. 566- 580.e10, 2017.

MALOTT, K. F.; LUDERER, U. Toxicant Effects on Mammalian Oocyte Mitochondria. **Biology of Reproduction**, p. 1–10, 2021.

MANACH, C. et al. Bioavailability of rutin and quercetin in rats. **FEBS Letters**, v. 409, n. 1, p. 12–16, 1997.

MANS, L. A. et al. The tumor suppressor LKB1 regulates starvation-induced autophagy under systemic metabolic stress. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

MARTELLI, A. et al. Insights into Ovarian Follicle Angiogenesis : Morphological and Chronological Vascular Remodeling from Primordial to Ovulating Follicles. **SM Vascular Medicine**, v. 2, n. 1, p. 1–10, 2017.

MASCARAQUE, C. et al. Rutin has intestinal antiinflammatory effects in the CD4+ CD62L+ T cell transfer model of colitis. **Pharmacological Research**, v. 90, p. 48–57, 2014.

MATA-CAMPUZANO, M. et al. Effect of Several Antioxidants on Thawed Ram Spermatozoa Submitted to 37°C up to Four Hours. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 6, p. 907–914, 2012.

MATSUDA, F. et al. Expression and function of apoptosis initiator FOXO3 in granulosa cells during follicular atresia in pig ovaries. **Journal of Reproduction and Development**, v. 57, n. 1, p. 151–158, 2011.

MATSUDA, F. et al. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: Regulation by survival and death of granulosa cells. **Journal of Reproduction and Development**, v. 58, n. 1, p. 44–50, 2012.

MBEMYA, G. T. et al. Early ovine preantral follicles have a potential to grow until antral

stage in two-step culture system in the presence of aqueous extract of *Justicia insularis*.

**Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. 8, p. 1121–1130, 2019.

MCCULLY, J. D. et al. Differential contribution of necrosis and apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 286, n. 5 55-5, 2004.

MCLAUGHLIN, M. et al. Metaphase II oocytes from human unilaminar follicles grown in a multistep culture system. **Molecular Human Reproduction**, v. 24, n. 3, p. 135–142, 2018.

MEHFOOZ, A. et al. Protective roles of Rutin against restraint stress on spermatogenesis in testes of adult mice. **Tissue and Cell**, v. 50, n. July 2017, p. 133–143, 2018.

MENEZES, V. G. et al. Extract of *Amburana cearensis* maintains the survival of ovine preantral follicles during long-term ovarian tissue transport and promotes primordial follicle activation after in vitro culture. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 5, p. 2001–2006, 2018.

MENG, L. et al. Dietary-Induced Chronic Hypothyroidism Negatively Affects Rat Follicular Development and Ovulation Rate and Is Associated with Oxidative Stress1. **Biology of Reproduction**, v. 94, n. 4, 2016.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 4, p. 673–751, 2000.

MIKUŁA-PIETRASIK, J. et al. Comprehensive review on how platinum- and taxane-based chemotherapy of ovarian cancer affects biology of normal cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, n. 4, p. 681–697, 2019.

MONNIAUX, D. Driving folliculogenesis by the oocyte-somatic cell dialog: Lessons from genetic models. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 41–53, 2016.

MONTE, A. P. O. et al. Involvement of Phosphorylated Akt and FOXO3a in the Effects of Growth and Differentiation Factor-9 (GDF-9) on Inhibition of Follicular Apoptosis and Induction of Granulosa Cell Proliferation After In Vitro Culture of Sheep Ovarian Tissue. **Reproductive Sciences**, 2021.

MORETTI, E. et al. Effect of quercetin, rutin, naringenin and epicatechin on lipid peroxidation induced in human sperm. **Reproductive Toxicology**, v. 34, n. 4, p. 651–657, 2012.

MUHAMMAD, A. et al. Sickling-preventive effects of rutin is associated with modulation of deoxygenated haemoglobin, 2,3-bisphosphoglycerate mutase, redox status and alteration of functional chemistry in sickle erythrocytes. **Heliyon**, v. 5, n. 6, p. e01905, 2019.

NAFEES, S. et al. Rutin ameliorates cyclophosphamide induced oxidative stress and inflammation in Wistar rats: Role of NFκB/MAPK pathway. **Chemico-Biological Interactions**, v. 231, p. 98–107, 2015.

NAGATA, S. Apoptosis by death factor. **Cell**, v. 88, n. 3, p. 355–365, 1997.

NAGATA, S. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. **Annual Review of Immunology**, v. 36, p. 489–517, 2018.

NAJAFI, M. et al. The role of melatonin on doxorubicin-induced cardiotoxicity: A systematic review. **Life Sciences**, v. 241, p. 117173, 2020.

NASCIMENTO, T. S. et al. Effect of red propolis extract isolated or encapsulated in nanoparticles on the in vitro culture of sheep preantral follicle: Impacts on antrum formation, mitochondrial activity and glutathione levels. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. 1, p. 31–38, 2019.

NATH, P.; MAITRA, S. Physiological relevance of nitric oxide in ovarian functions: An overview. **General and Comparative Endocrinology**, v. 279, n. September, p. 35–44, 2019.

NAYKI, C. et al. The effect of rutin on ovarian ischemia-reperfusion injury in a rat model. **Gynecological Endocrinology**, v. 34, n. 9, p. 809–814, 2018.

NGUYEN, Q. N. et al. Cisplatin- and cyclophosphamide-induced primordial follicle depletion is caused by direct damage to oocytes. **Mol Hum Reprod**, v. 25, n. 8, p. 433–444, 2019.

NISHI, K. et al. Doxorubicin-induced female reproductive toxicity: an assessment of ovarian follicular apoptosis, cyclicity and reproductive tissue histology in Wistar rats. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 1, p. 72–81, 2018.

- NOURI, Z. et al. **Targeting multiple signaling pathways in cancer: The rutin therapeutic approach.** [s.l: s.n.]. v. 12
- OBOH, G. et al. Rutin restores neurobehavioral deficits via alterations in cadmium bioavailability in the brain of rats exposed to cadmium. **NeuroToxicology**, v. 77, p. 12–19, 2020.
- OLUDELE, O. J.; ADISA, B. A.; OLUFUNSO, O. O. Regulated rutin co-administration reverses mitochondrial-mediated apoptosis in *Plasmodium berghei*-infected mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 522, n. 2, p. 328–334, 2020.
- PAMPANINI, V. et al. Impact of first-line cancer treatment on the follicle quality in cryopreserved ovarian samples from girls and young women. **Human Reproduction**, v. 34, n. 9, p. 1674–1685, 2019.
- PAN, R. Y. et al. Sodium rutin ameliorates Alzheimer's disease-like pathology by enhancing microglial amyloid- $\beta$  clearance. **Science Advances**, v. 5, n. 2, p. 1–16, 2020.
- PANDEY, A. N. et al. Reactive oxygen and nitrogen species during meiotic resumption from diplotene arrest in mammalian oocytes. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 111, n. 3, p. 521–528, 2010.
- PANGAS, S. A. Regulation of the ovarian reserve by members of the transforming growth factor beta family. **Molecular Reproduction and Development**, v. 79, n. 10, p. 666–679, 2012.
- PEDERSEN, T.; PETERS, H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. **Journal of reproduction and fertility**, v. 17, n. 3, p. 555–557, 1968.
- PFANNER, N.; WARSCHEID, B.; WIEDEMANN, N. Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 5, p. 267–284, 2019.
- PIRES, K. M. et al. Activation of IGF-1 receptors and Akt signaling by systemic hyperinsulinemia contributes to cardiac hypertrophy but does not regulate cardiac autophagy in obese diabetic mice. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 113, p. 39–50, 2017.

PLAZAS, D. C. S. **EFEITO DOS EXTRATOS DE *Spirulina maxima* E Kefir NO CULTIVO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS DE SUINO**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2015.

POLYAK, K. et al. Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. **Nature Genetics**, v. 20, n. 3, p. 291–293, 1998.

PORTELA, A. M. L. R. et al. Effects of different concentrations of concanavalin A and follicle stimulating hormone on goat primordial follicles activation, survival and gene expression. **Small Ruminant Research**, v. 116, n. 2–3, p. 183–191, 2014.

PRASAD, R.; PRASAD, S. B. Antitumor Activity of Rutin-Cisplatin in Combination and Its Protective Effect Against Hematotoxicity. v. 4, n. 42, p. 42–56, 2018.

PRASASYA, R. D.; MAYO, K. E. **Regulation of Follicle Formation and Development by Ovarian Signaling Pathways**. 3. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 82, n. 4, p. 513–523, 2011.

PUGAZHENDHI, A. et al. Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organs systems. **Life Sciences**, v. 200, p. 26–30, 2018.

PULIDO, R. PTEN inhibition in human disease therapy. **Molecules**, v. 23, n. 2, 2018.

QU, S. et al. Rutin attenuates vancomycin-induced renal tubular cell apoptosis via suppression of apoptosis, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 8, p. 2056–2063, 2019.

QUINTANILHA, J. C. F. et al. Role of epigenetic mechanisms in cisplatin-induced toxicity. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 137, p. 131–142, 2019.

R. J. S. GONÇALVES. **Efeito de diferentes meios e períodos para conservação de ovários caprinos e ovinos sobre a morfologia, a apoptose e o crescimento in vitro de folículos pré-antrais**. [s.l.] Universidade Federal do Vale do São Francisco, 2012.

RAJAGOPALAN, G.; CHANDRASEKARAN, S. P.; CARANI VENKATRAMAN, A. Troxerutin attenuates diet-induced oxidative stress, impairment of mitochondrial biogenesis and respiratory chain complexes in mice heart. **Clinical and Experimental**

**Pharmacology and Physiology**, v. 44, n. 1, p. 103–113, 2017.

RAMALINGAYYA, G. V. et al. Rutin Protects against Doxorubicin-Induced Cognitive Dysfunction While Retaining the Anticancer Potential of Dox in a Murine Model of N-Methyl-N-Nitrosourea - Induced Mammary Carcinoma. **J Environ Pathol Toxicol Oncol**, v. 38, n. 2, p. 153–163, 2019.

REDDY, P. et al. Oocyte-specific deletion of pten causes premature activation of the primordial follicle pool. **Science**, v. 319, n. 5863, p. 611–613, 2008.

REDDY, P. et al. PDK1 signaling in oocytes controls reproductive aging and lifespan by manipulating the survival of primordial follicles. **Human Molecular Genetics**, v. 18, n. 15, p. 2813–2824, 2009.

RIBEIRO, A. E. A. S. et al. Efeitos inibitórios de *Morus nigra* L. (Moraceae) contra o edema local da pata e a hipernocicepção mecânica induzida pelo veneno de *Bothrops jararacussu* em camundongos. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 111, p. 1046–1056, 2019.

RIBEIRO, R. P. et al. Effects of jacalin and follicle-stimulating hormone on in vitro goat primordial follicle activation, survival and gene expression. **Zygote**, v. 23, n. 4, p. 537–549, 2015.

RICHARDS, J. A. S. et al. Molecular mechanisms of ovulation and luteinization. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, n. 1–2, p. 47–54, 1998.

RIMON-DAHARI, N. et al. Ovarian folliculogenesis. In: **Results and Problems in Cell Differentiation**. [s.l.: s.n.]. v. 58p. 167–190.

ROSSI, V. et al. LH prevents cisplatin-induced apoptosis in oocytes and preserves female fertility in mouse. **Cell Death and Differentiation**, v. 24, n. 1, p. 72–82, 2017.

ROTH, Z. Symposium review: Reduction in oocyte developmental competence by stress is associated with alterations in mitochondrial function1. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 4, p. 3642–3654, 2018.

RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca anatomica**, v. 24, p. 77–92, 1983.

RYBSKA, M. et al. Characteristic of factors influencing the proper course of



folliculogenesis in mammals. **Medical Journal of Cell Biology**, v. 6, n. 1, p. 33–38, 2018.

SÁ, N. A. R. et al. First pregnancy after in vitro culture of early antral follicles in goats: Positive effects of anethole on follicle development and steroidogenesis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 87, n. 9, p. 966–977, 2020.

SAID, R. S.; MANTAWY, E. M.; EL-DEMERDASH, E. Mechanistic perspective of protective effects of resveratrol against cisplatin-induced ovarian injury in rats: emphasis on anti-inflammatory and anti-apoptotic effects. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 392, n. 10, p. 1225–1238, 2019.

SAIKUMAR, P. et al. Apoptosis: Definition, mechanisms, and relevance to disease. **American Journal of Medicine**, v. 107, n. 5, p. 489–506, 1999.

SALEH, A. et al. Rutin and orlistat produce antitumor effects via antioxidant and apoptotic actions. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 392, n. 2, p. 165–175, 2019.

SALEM, E. A.; SALEM, N. A.; HELLSTROM, W. J. Therapeutic effect of ozone and rutin on adriamycin-induced testicular toxicity in an experimental rat model. **Andrologia**, v. 49, n. 1, 2017.

SAMARE-NAJAF, M.; ZAL, F.; SAFARI, S. Primary and Secondary Markers of Doxorubicin-Induced Female Infertility and the Alleviative Properties of Quercetin and Vitamin E in a Rat Model. **Reproductive Toxicology**, v. 96, n. July, p. 316–326, 2020.

SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1822, p. 1896–1912, 2012.

SANTOS, J. et al. Immunohistochemical Localization of Fibroblast Growth Factor-2 in the Sheep Ovary and its Effects on Pre-antral Follicle Apoptosis and Development In Vitro. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 3, p. 522–528, 2014.

SANTOS, J. M. S. et al. Kaempferol promotes primordial follicle activation through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signaling pathway and reduces DNA fragmentation of sheep preantral follicles cultured in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 86, n. 3, p. 319–329, 2019a.

SANTOS, J. M. S. et al. Kaempferol can be used as the single antioxidant in the in vitro

culture medium, stimulating sheep secondary follicle development through the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. **Theriogenology**, v. 136, p. 86–94, 2019b.

SATARI, A. et al. Synergetic impact of combined 5-fluorouracil and rutin on apoptosis in PC3 cancer cells through the modulation of P53 gene expression. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 9, n. 3, p. 462–469, 2019.

SCHIRONE, L. et al. A Review of the Molecular Mechanisms Underlying the Development and Progression of Cardiac Remodeling. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.

SCHULTE, M. et al. ADAM10 regulates FasL cell surface expression and modulates FasL-induced cytotoxicity and activation-induced cell death. **Cell Death and Differentiation**, v. 14, n. 5, p. 1040–1049, 2007.

SEO, S. et al. Rutin increases muscle mitochondrial biogenesis with AMPK activation in high-fat diet-induced obese rats. **Nutrients**, v. 7, n. 9, p. 8152–8169, 2015.

SHAH, J. S. et al. Biomechanics and mechanical signaling in the ovary: a systematic review. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 35, n. 7, p. 1135–1148, 2018.

SHAW, J. M.; ORANRATNACHAI, A.; TROUNSON, A. O. Fundamental cryobiology of mammalian, oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 59–72, 2000.

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, n. 9, p. 1691–1704, 2004.

SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; FIGUEIREDO, J. R. Ovarian follicle development in vitro and oocyte competence: Advances and challenges for farm animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 55, p. 123–135, 2016.

SINGH, A. et al. Podophyllotoxin and rutin modulates ionizing radiation-induced oxidative stress and apoptotic cell death in mice bone marrow and spleen. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. FEB, p. 1–15, 2017.

SINGH, R. et al. Mechanisms of cisplatin sensitivity and resistance in testicular germ cell tumors. **Cancer Drug Resist**, v. 2, n. 3, p. 580–594, 2019a.

- SINGH, S. et al. Rutin protects t-butyl hydroperoxide-induced oxidative impairment via modulating the Nrf2 and iNOS activity. **Phytomedicine**, v. 55, p. 92–104, 2019b.
- SIROTKIN, A. V. et al. Rutin directly affects stimulatory action of FSH on the ovarian cell. **PharmaNutrition**, v. 15, n. September 2020, p. 100247, 2021.
- SITI, H. N. et al. Roles of rutin in cardiac remodeling. **Journal of Functional Foods**, v. 64, n. October, p. 103606, 2020.
- SOLEIMANI, R. et al. Mechanisms of chemotherapy-induced human ovarian aging: double strand DNA breaks and microvascular compromise. **Aging**, v. 3, n. 8, p. 782–793, 2011.
- SONG, B. S. et al. The effects of kinase modulation on in vitro maturation according to different cumulusoocyte complex morphologies. **PLoS ONE**, v. 13, n. 10, 2018.
- SONIGO, C. et al. The impact of chemotherapy on the ovaries: Molecular aspects and the prevention of ovarian damage. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 21, 2019.
- SOSA, V. et al. Oxidative stress and cancer: an overview. **Ageing research reviews**, v. 12, n. 1, p. 376–390, 2013.
- SOYMAN, Z. et al. Can ebselen prevent cisplatin-induced ovarian damage? **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 297, n. 6, p. 1549–1555, 2018.
- SPEARS, N. et al. Ovarian damage from chemotherapy and current approaches to its protection. **Human Reproduction Update**, v. 25, n. 6, p. 673–693, 2019.
- SPENCER, J. P. E. et al. The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. **FEBS Letters**, v. 458, n. 2, p. 224–230, 1999.
- STEFANSON, A. L.; BAKOVIC, M. Dietary regulation of Keap1/Nrf2/ARE pathway: Focus on plant-derived compounds and trace minerals. **Nutrients**, v. 6, n. 9, p. 3777–3801, 2014.
- STOCCO, D. M. StAR Protein and the Regulation of Steroid Hormone Biosynthesis. **Annual Review of Physiology**, v. 63, n. 1, p. 193–213, 2001.
- STRASSER, A.; JOST, P. J.; NAGATA, S. The Many Roles of FAS Receptor Signaling in

the Immune System. **Immunity**, v. 30, n. 2, p. 180–192, 2009.

SUI, X. X. et al. Evidence that FOXO3a is involved in oocyte apoptosis in the neonatal rat ovary 1. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 88, n. 4, p. 621–628, 2010.

SUN, J. et al. Rutin attenuates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidation damage and apoptosis in Leydig cells by activating PI3K/Akt signal pathways. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 88, p. 500–506, 2017.

SURAI, P. F. Antioxidant systems in animal body. In: **Selenium in nutrition and health**. [s.l: s.n.]. p. 985–994.

SURAI, P. F.; FISININ, V. I.; KARADAS, F. Antioxidant systems in chick embryo development. Part 1. Vitamin E, carotenoids and selenium. **Animal Nutrition**, v. 2, n. 1, p. 1–11, 2016.

SZYMANSKA, K. J.; TAN, X.; OKTAY, K. Unraveling the mechanisms of chemotherapy-induced damage to human primordial follicle reserve: road to developing therapeutics for fertility preservation and reversing ovarian aging. **Molecular Human Reproduction**, 2020.

TAKAE, S.; SUZUKI, N. Ovarian endocrinology. In: **Development of In Vitro Maturation for Human Oocytes: Natural and Mild Approaches to Clinical Infertility Treatment**. [s.l: s.n.]. p. 3–35.

TAŞLI, N. G. et al. The effects of rutin on cisplatin induced oxidative retinal and optic nerve injury: an experimental study. **Cutaneous and Ocular Toxicology**, v. 37, n. 3, p. 252–257, 2018.

TAUBER, S.; STEINBRENNER, H.; KLOTZ, L.-O. FoxO transcription factors in the control of redox homeostasis and fuel metabolism. In: **Oxidative Stress**. [s.l: s.n.]. p. 315–330.

TELFER, E. E. Future developments: In vitro growth (IVG) of human ovarian follicles. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 98, n. 5, p. 653–658, 2019.

THABET, N. M.; MOUSTAFA, E. M. Protective effect of rutin against brain injury induced by acrylamide or gamma radiation: role of PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$ /NRF-2 signalling pathway. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 124, n. 2, p. 185–193, 2018.

- TILLY, J. L.; SINCLAIR, D. A. Germline energetics, aging, and female infertility. **Cell Metab**, v. 17, p. 838–850, 2013.
- TOPAL, İ. et al. The effect of rutin on cisplatin-induced oxidative cardiac damage in rats. **Anatolian Journal of Cardiology**, v. 20, n. 3, p. 136–142, 2018.
- VAN DER ZANDEN, S. Y.; QIAO, X.; NEEFJES, J. New insights into the activities and toxicities of the old anticancer drug doxorubicin. **FEBS Journal**, p. 1–17, 2020.
- VARELA-LÓPEZ, A. et al. An update on the mechanisms related to cell death and toxicity of doxorubicin and the protective role of nutrients. **Food and Chemical Toxicology**, v. 134, n. September, p. 110834, 2019.
- VASCONCELOS, E. M. et al. Eugenol influences the expression of messenger RNAs for superoxide dismutase and glutathione peroxidase 1 in bovine secondary follicles cultured in vitro. **Zygote**, 2021.
- VÁZQUEZ-FLORES, L. F. et al. Antioxidant, Antiinflammatory, and Antifibrotic Properties of Quercetin in the Liver. In: **Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants**. [s.l.: s.n.]. p. 653–674.
- VON WOLFF, M. et al. Practical recommendations for fertility preservation in women by the FertiPROTEKT network. Part II: fertility preservation techniques. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 297, n. 1, p. 257–267, 2018.
- WAGNER, M. et al. Single-cell analysis of human ovarian cortex identifies distinct cell populations but no oogonial stem cells. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 2020.
- WANG, Y. DI et al. Cardioprotective effects of rutin in rats exposed to pirarubicin toxicity. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 20, n. 4, p. 361–373, 2018a.
- WANG, R. et al. Rutin, A Natural Flavonoid Protects PC12 Cells Against Sodium Nitroprusside-Induced Neurotoxicity Through Activating PI3K/Akt/mTOR and ERK1/2 Pathway. **Neurochemical Research**, v. 40, n. 9, p. 1945–1953, 2015.
- WANG, S. et al. The Role of Antioxidant Enzymes in the Ovaries. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017a.
- WANG, S. et al. Niacin inhibits apoptosis and rescues premature ovarian failure. **Cellular**

**Physiology and Biochemistry**, v. 50, n. 6, p. 2060–2070, 2018b.

WANG, T. et al. Mitochondrial dysfunction and ovarian aging. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 77, n. 5, 2017b.

WANG, W. et al. N-Acetylcysteine protects inner ear hair cells and spiral ganglion neurons from manganese exposure by regulating ROS levels. **Toxicology Letters**, v. 279, p. 77–86, 2017c.

WANG, Y. et al. Doxorubicin obliterates mouse ovarian reserve through both primordial follicle atresia and overactivation. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 381, n. July, p. 114714, 2019.

XIAO, S. et al. Doxorubicin has dose-dependent toxicity on mouse ovarian follicle development, hormone secretion, and oocyte maturation. **Toxicological Sciences**, v. 157, n. 2, p. 320–329, 2017.

YAMAMOTO, K. et al. Development of live young from bovine small oocytes after growth, maturation and fertilization in vitro. **Theriogenology**, v. 52, n. 1, p. 81–89, 1999.

YANG, C. Y. et al. Bioavailability and metabolic pharmacokinetics of rutin and quercetin in rats. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 13, n. 3, p. 244–250, 2005.

YANG, H. et al. Rutin alleviates hypoxia/reoxygenation-induced injury in myocardial cells by up-regulating SIRT1 expression. **Chemico-Biological Interactions**, v. 297, p. 44–49, 2019.

YAŞAR, H. et al. Peripheral neurotoxic effects of cisplatin on rats and treatment with rutin. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 28, n. 11, p. 1537–1543, 2019.

YASHAVARDDHAN, M. H. et al. Targeting DNA repair through podophyllotoxin and rutin formulation in hematopoietic radioprotection: An in silico, in vitro, and in vivo study. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. OCT, p. 1–17, 2017.

YUAN, S.; AKEY, C. W. Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. **Structure**, v. 21, n. 4, p. 501–515, 2013.

YUAN, X. et al. Rutin ameliorates obesity through brown fat activation. **FASEB Journal**,

v. 31, n. 1, p. 333–345, 2017.

ZENG, X. et al. Mitochondrial Dysfunction in Polycystic Ovary Syndrome. **DNA and Cell Biology**, v. 00, n. 00, p. 1–9, 2020.

ZHANG, B. FANG et al. The role of AKT and FOXO3 in preventing ovarian toxicity induced by cyclophosphamide. **PLoS ONE**, v. 13, n. 8, p. 1–12, 2018.

ZHANG, J. et al. Polycystic ovary syndrome and mitochondrial dysfunction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 17, n. 1, p. 1–15, 2019.

ZHANG, P. et al. Rutin increases the cytotoxicity of temozolomide in glioblastoma via autophagy inhibition. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 132, n. 3, p. 393–400, 2017a.

ZHANG, T. et al. Effect of doxorubicin-induced ovarian toxicity on mouse ovarian granulosa cells. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 86, p. 1–10, 2017b.

ZHANG, X. et al. Regulation of Necroptosis by Phospholipids and Sphingolipids. **Cells**, v. 9, n. 3, p. 627, 2020.

ZHANG, Y. et al. Goserelin can inhibit ovarian cancer proliferation and simultaneously protect ovarian function from cisplatin: An in vitro and in vivo study. **Journal of Chemotherapy**, v. 25, n. 2, p. 96–103, 2013.

ZHAO, B. et al. Rutin promotes osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells through the GPR30-mediated PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. **Experimental Biology and Medicine**, v. 245, n. 6, p. 552–561, 2020.

ZHAO, Q. et al. Exposure to bisphenol A at physiological concentrations observed in Chinese children promotes primordial follicle growth through the PI3K/Akt pathway in an ovarian culture system. **Toxicology in Vitro**, v. 28, n. 8, p. 1424–1429, 2014.

ZHENG, W. et al. Functional roles of the phosphatidylinositol 3-kinases (PI3Ks) signaling in the mammalian ovary. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 356, n. 1–2, p. 24–30, 2012.

ZHOU, C. et al. Tea polyphenol protects against cisplatin-induced meiotic defects in porcine oocytes. **Aging**, v. 11, n. 13, p. 4706–4719, 2019.

ZHOU, J.; PENG, X.; MEI, S. Autophagy in ovarian follicular development and Atresia.

**International Journal of Biological Sciences**, v. 15, n. 4, p. 726–737, 2019.

ZHOU, M. et al. Atomic structure of the apoptosome: Mechanism of cytochrome c- and dATP-mediated activation of Apaf-1. **Genes and Development**, v. 29, n. 22, p. 2349–2361, 2015.

ZHOU, Z.; HAN, V.; HAN, J. New components of the necroptotic pathway. **Protein and Cell**, v. 3, n. 11, p. 811–817, 2012.



## 8. ANEXOS

Maps rutin FOXO3a - Goo... rutin antiviral - Goo... Guia para autores -...

Pesquisar Reunir-se Agora

Responder Excluir Arquivar Lixo Eletrônico Limpar Mover para Categorizar Adiar

← Please verify your contribution to Rutin promotes activation and reduces apoptosis of primordial follicles by regulation of Akt phosphorylation after in vitro culture of ovine ovarian tissue

Traduzir a mensagem para: Português (Brasil) | Nunca traduzir do: Inglês

**T** Theriogenology <em@editorialmanager.com>  
Seg, 08/02/2021 12:05  
Para: Você

\*This is an automated message.\*

Journal: Theriogenology  
Title: Rutin promotes activation and reduces apoptosis of primordial follicles by regulation of Akt phosphorylation after in vitro culture of ovine ovarian tissue  
Corresponding Author: Professor Maria Helena Tavares Matos  
Co-Authors: T.L.B.G. Lins; R.S. Barberino; A.P.O. Monte; J.G.C. Pinto; D.S.P. Campinho; R.C. Palheta  
Manuscript Number:

Dear Lins,

Professor Maria Helena Tavares Matos submitted this manuscript via Elsevier's online submission system, Editorial Manager, and you have been listed as a Co-Author of this submission.

Elsevier asks Co-Authors to confirm their consent to be listed as Co-Author and track the papers status. In order to confirm your connection to this submission, please click here to confirm your co-authorship: <https://www.editorialmanager.com/therio/l.asp?i=211292&l=GWJJCLM0>

If you have not yet registered for the journal on Editorial Manager, you will need to create an account to complete this confirmation. Once your account is set up and you have confirmed your status as Co-Author of the submission, you will be able to view and track the status of the submission as it goes through the editorial process by logging in at <https://www.editorialmanager.com/therio/>



## Rutin prevents cisplatin-induced ovarian damage via antioxidant activity and regulation of PTEN and FOXO3a phosphorylation in mouse model

Thae Lanne B.G. Lins<sup>a</sup>, Bruna B. Gouveia<sup>a</sup>, Ricássio S. Barberino<sup>a</sup>, Regina L.S. Silva<sup>a</sup>, Alane P.O. Monte<sup>a</sup>, Joisyleide G.C. Pinto<sup>a</sup>, Daniela S.P. Campinho<sup>a</sup>, Raimundo C. Palheta Jr.<sup>b</sup>, Maria H.T. Matos<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Nucleus of Biotechnology Applied to Ovarian Follicle Development, Federal University of São Francisco Valley, 56300-990, Petrolina, PE, Brazil*

<sup>b</sup> *Laboratory of Veterinary Pharmacology, Department of Veterinary Medicine, Federal University of São Francisco Valley, 56300-990, Petrolina, PE, Brazil*

### ARTICLE INFO

#### Keywords

Oxidative stress  
Oocyte  
Ovarian function  
Chemotherapy  
PI3K pathway

### ABSTRACT

The aims of the present study were to evaluate the protective effects of rutin during cisplatin-induced ovarian toxicity in mice and to verify the possible involvement of the phosphatase and tension homolog (PTEN)/Forkhead box O3a (FOXO3a) pathway in the rutin actions. Mice received saline solution (control, 0.15 M, i.p.) or cisplatin (5 mg/Kg body weight, i.p.) or they were pretreated with N-acetylcysteine (positive control; 150 mg/Kg of body weight [p.o.]) or with rutin (10, 30 or 50 mg/Kg body weight, p.o.) before cisplatin (5 mg/Kg body weight, i.p.) once daily for 3 days. Next, the ovaries were harvested and destined to histological (follicular morphology and activation), immunohistochemical (cell proliferation and apoptosis) and fluorescence (reactive oxygen species [ROS], glutathione [GSH] and mitochondrial activity) analyses. Moreover, the expression of phosphorylated PTEN (p-PTEN) and FOXO3a (p-FOXO3a) were evaluated to investigate a molecular mechanism by which rutin would prevent the cisplatin-induced ovarian damage. The results showed that pretreatment with N-acetylcysteine or 10 mg/Kg rutin before cisplatin preserved the percentage of normal follicles and cell proliferation, reduced apoptosis and ROS levels and increased active mitochondria and GSH levels compared to the cisplatin treatment ( $P < 0.05$ ). Cisplatin treatment increased p-PTEN and decreased p-FOXO3a expression in follicles, which was prevented by 10 mg/kg rutin. In conclusion, treatment with 10 mg/Kg rutin has the potential to protect the ovarian follicles against cisplatin-induced toxicity through its antioxidant effects and PTEN/FOXO3a pathway.

### 1. Introduction

Cisplatin (Cis-diamminedichloridoplatinum-II [Cis-DDP]) is one of the most potential and widely used drugs for the treatment of cancer in different organs, including ovary and testicle [1,2]. However, antineoplastic therapy with cisplatin may lead to loss of primordial follicles, resulting in the depletion of the ovarian reserve and consequent premature ovarian failure [3,4]. The toxic effects of cisplatin in the ovary are associated with DNA lesion, increase of reactive oxygen species (ROS) levels and damage to the mitochondria, which finally lead to ovarian oxidative injury and follicular apoptosis [4–6]. To overcome these side effects, the administration of an antioxidant during chemotherapy may prevent the toxicity of cisplatin on ovarian function [7–9]. In this context, rutin is one of the promising antioxidants.

The flavonoid rutin (quercetin-3-O-rutinoside) is predominantly found in the buckwheat, cranberries, mulberry and citrus fruits. Con-

sidering its health benefits due to the antidiabetic, anti-inflammatory, antitumor, antibacterial and antioxidant effects, rutin provides promising applications in the pharmaceutical and cosmetic industries [10–14]. In experimental antineoplastic therapy, rutin showed synergistic activity with cisplatin in Dalton's lymphoma cells death, but rutin also reduced its side effects in hematological parameters [15], and prevented the damage in brain [16], retinal and optic nerve [17], heart [18] and testicles [19]. Moreover, rutin protects against doxorubicin-induced neurotoxicity without affecting its antitumor potential in a murine model of mammary carcinoma [20]. These results can be related to the antioxidant effects of the rutin like inhibition of ROS generation, increase in the activity of antioxidant enzymes, such as glutathione (GSH), and prevention of lipid peroxidation, attenuating DNA and mitochondrial damage [21–23].

Rutin actions can be regulated by phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling pathway members, which are important for the maintenance of cell survival and growth, such as phosphatase and

\* Corresponding author at: Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Colegiado de Medicina Veterinária - Laboratório de Biologia Celular, Citologia e Histologia, Rodovia BR 407, Km 12, Lote 543 - Projeto de Irrigação Nilo Coelho - S/N, Cl, CEP: 56300-990, Petrolina, PE, Brazil.  
E-mail address: [helena.matos@univasf.edu.br](mailto:helena.matos@univasf.edu.br) (M.H.T. Matos)



## Certificado de autorização

Certificamos que a proposta intitulada: "Efeito da rotina sobre a toxicidade ovariana aguda e crônica induzida por cisplatina, doxorrubicina ou ciclofosfamida em camundongos fêmeas", registrada com o nº 0004/280918, sob a responsabilidade de **Maria Helena Tavares de Matos** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF, em 28/09/2018.

Finalidade	( ) Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/04/2019 a 30/12/2020
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i>
Nº de animais	216
Peso/Idade	25 - 30g/ 8 semanas
Sexo	F
Origem	Biotério da UNIVASF – Campus Ciências Agrárias (CCA)

Em: 15/03/2019

**KARINE VIEIRA ANTUNES**  
 Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animais  
 CEUA/UNIVASF