



RENORBIO – REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**EFEITO DO KAEMPFEROL SOBRE O DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE
FOLÍCULOS OVARIANOS OVINOS**

JAMILE MAIARA DA SILVA SANTOS

Recife - PE

2018

JAMILE MAIARA DA SILVA SANTOS

**EFEITO DO KAEMPFEROL SOBRE O DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE
FOLÍCULOS OVARIANOS OVINOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), como requisito para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia em Agropecuária.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Helena Tavares de Matos

Recife - PE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

S237e Santos, Jamile Maiara da Silva
Efeito do kaempferol sobre o desenvolvimento in vitro de
folículos ovarianos ovinos / Jamile Maiara da Silva Santos. – 2018.
152 f. : il.

Orientadora: Maria Helena Tavares de Matos.
Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia – RENORBIO, Recife, BR-PE, 2018. Ponto focal em
Pernambuco – Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Inclui referências e apêndice(s).

1. Ovinos 2. Antioxidantes 3. Flavonóides 4. Biotecnologia
I. Matos, Maria Helena Tavares de, orient. II. Título

CDD 620.8

TERMO DE APROVAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
RENORBIO

TESE DE DOUTORADO ELABORADA POR:

JAMILE MAIARA DA SILVA SANTOS

**Efeito do kaempferol sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos
ovarianos ovinos**

BANCA EXAMINADORA

Tese defendida e aprovada pela banca examinadora em: 21 de dezembro de
2018.

Orientador:

Profa. Dra. Maria Helena Tavares De Matos
Colegiado de Medicina Veterinária da UNIVASF

Examinadores:

Profa. Dra. Aurea Wischral
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes Da Silva Almeida
Colegiado de Farmácia da UNIVASF

Profa. Dra. Adriana Gradela
Colegiado de Medicina Veterinária da UNIVASF

Dra. Alane Pains Oliveira Do Monte
Laboratório de Biologia Celular, Citologia e Histologia da UNIVASF

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, por iluminar meus passos, pelas oportunidades e vitórias obtidas. Agradeço por sempre estar comigo me orientando a tomar decisões corretas, sempre me proporcionando força e coragem para conclusão de mais uma etapa da minha vida.

Aos meus pais, José Cleub da Silva Santos e Maria Luiza de Jesus Santos. Especialmente a minha mãe, por tanto amor, carinho, compreensão e pedidos de calma. Por me ensinar a ser persistente e determinada. Ela sabe o quanto foi difícil a trajetória para chegar até aqui... A ela, ficam os meus infindáveis agradecimentos.

Ao meu irmão José Cleub Silva Santos Júnior, pelo apoio em todos os momentos da minha vida. Obrigada pelo incentivo e pelos diversos conselhos.

À minha Tia Azinda Maria dos Santos, que considero como minha segunda mãe, pessoa muito especial e querida para mim. Obrigada por sempre me apoiar.

À uma pessoa que se tornou muito especial: Ezaú Tertuliano da Silva. Sabes da importância que tens na minha vida e és prova de que o verdadeiro gostar é demonstrado nos momentos de dificuldade. Obrigada pela parceria.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Helena Tavares de Matos. Obrigada pela disponibilidade de orientação, por ter acreditado em mim, por toda a paciência e por ser o meu exemplo de excelente profissional que ama o que faz. Não poderia deixar de agradecê-la também por ter entendido os momentos em que precisei ausentar-me, por motivos pessoais. Agradeço de coração por tudo!

Às instituições: Universidade Federal do Vale do São Francisco e Universidade Federal Rural de Pernambuco pela oportunidade de realização do doutorado.

Ao grupo de pesquisa Biotecnologia Aplicada ao Desenvolvimento de Folículos Ovarianos (BIOFOV), pelos momentos de parceria e aprendizado. Vocês foram muito importantes nessa caminhada.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) por todos os ensinamentos.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa (PROCESSO Nº: 0515-5.05/14).

À banca de defesa, por todas as sugestões em prol da melhoria desse trabalho.
Meus agradecimentos!

Só me resta, uma imensa gratidão àquelas pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para minha formação.

A minha Mãe, que me ensinou
as coisas mais essenciais da vida.

DEDICO

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito do kaempferol sobre o cultivo *in vitro* de tecido ovariano e de folículos secundários isolados da espécie ovina. Para isso, foram realizadas duas fases experimentais, divididas em dois capítulos. Para o cultivo de tecido ovariano (cultivo *in situ* - capítulo 1), os fragmentos de córtex foram cultivados por 7 dias em meio controle (α -MEM⁺) ou em α -MEM⁺ adicionado de diferentes concentrações de kaempferol (0,1; 1; 10 ou 100 μ M). O meio controle era constituído de α -MEM suplementado com insulina, transferrina, selênio, glutamina, hipoxantina, albumina sérica bovina (BSA), penicilina e estreptomicina, chamado α -MEM⁺. Após o cultivo, foram avaliados a morfologia, a ativação, o crescimento e a fragmentação do DNA dos folículos pré-antrais. Além disso, realizou-se a inibição farmacológica da via fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3k) e a imunohistoquímica para análise da expressão da proteína quinase B fosforilada (pAKT). No capítulo 2, os folículos secundários foram isolados e cultivados durante 12 dias em α -MEM suplementado com BSA, insulina, glutamina e hipoxantina (α -MEM: meio base sem antioxidantes) ou neste meio também adicionado por transferrina, selênio e ácido ascórbico (AO: meio base com antioxidantes). Além disso, foram adicionadas diferentes concentrações de kaempferol (0,1; 1 ou 10 μ M) aos diferentes meios de base: (α -MEM ou AO), totalizando 8 tratamentos. Após o cultivo de folículos isolados, os seguintes parâmetros foram avaliados: morfologia, formação de antro, diâmetro folicular, percentagem de oócitos ≥ 110 μ m, níveis de glutathione (GSH), atividade mitocondrial e percentagem de maturação *in vitro*. No capítulo 1, 10 μ M de kaempferol mostrou uma maior percentagem de ativação folicular e proliferação celular do que os outros tratamentos ($P < 0,05$) e uma percentagem de células TUNEL positivas semelhantes às do controle fresco e menor do que outros tratamentos ($P < 0,05$). O LY294002 inibiu significativamente a ativação do folículo primordial estimulada por α -MEM + e 10 μ M de kaempferol e reduziu a expressão de pAKT. Já no capítulo 2, a percentagem de folículos normais foi maior ($P < 0,05$) no meio AO com relação aos demais tratamentos e similares ($P > 0,05$) ao α -MEM suplementado com 1 ou 10 μ M kaempferol. Além disso, α -MEM mais 1 ou 10 μ M de kaempferol e meio AO apresentaram diâmetros foliculares, ovócitos totalmente crescidos e níveis de GSH similares ($P > 0,05$). A formação de antro foi maior ($P < 0,05$) em α -MEM + 1 μ M kaempferol do que em AO e similar ($P > 0,05$) a α -MEM + 10 μ M kaempferol. Além disso, α -MEM suplementado com 1 μ M de kaempferol apresentaram maiores ($P < 0,05$) níveis de mitocôndrias ativas do que α -MEM + 10 μ M de kaempferol e meio AO. Não houve diferença para as taxas de retomada meiótica ($P > 0,05$). Em conclusão, 10 μ M de kaempferol promove a ativação, reduz a fragmentação do DNA e aumenta a expressão de pAKT dos folículos pré-antrais ovinos cultivados *in situ*. Já para folículos secundários, 1 μ M de kaempferol pode ser utilizado como único antioxidante presente no meio base, substituindo a adição de transferrina, selênio e ácido ascórbico durante o cultivo *in vitro* e a retomada meiótica de oócitos oriundos de folículos secundários ovinos.

Palavras-chave: foliculogênese, AKT, preantral, PI3K, antioxidante.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effect of kaempferol on the *in vitro* culture of ovarian tissue and isolated secondary follicles in the ovine species. For this, two experimental phases were performed, divided in two chapters. For the culture of ovarian tissue (*in situ* culture – chapter 1), fragments of the cortex were cultured for 7 days in control medium (α -MEM+) or in α -MEM+ supplemented with different concentrations of kaempferol (0.1, 1, 10 or 100 μ M). The control medium consisted of α -MEM supplemented with insulin, transferrin, selenium, glutamine, hypoxanthine, bovine serum albumin (BSA), penicillin and streptomycin, called α -MEM+. After culture, morphology, activation, growth and DNA fragmentation of the preantral follicles were analyzed. In addition, we performed a pharmacological inhibition of the phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) pathway and the immunohistochemistry for analysis of phosphorylated protein kinase B (pAKT) expression. In chapter 2, the secondary follicles were isolated and cultured for 12 days in α -MEM supplemented with BSA, insulin, glutamine and hypoxanthine (α -MEM: base medium without antioxidants) or in this medium also supplemented with transferrin, selenium and ascorbic acid (AO: base medium with antioxidants). Moreover, different concentrations of kaempferol (0.1, 1 or 10 μ M) were added to the different base media: (α -MEM or AO), totaling 8 treatments. After culture of isolated follicles, the following parameters were analyzed: morphology, antrum formation, follicular diameter, percentage of oocytes \geq 110 μ m, glutathione (GSH) levels, mitochondrial activity and percentage of *in vitro* maturation. In Chapter 1, 10 μ M kaempferol showed a higher percentage of follicular activation and cell proliferation than the other treatments ($P < 0.05$) and a percentage of TUNEL positive cells similar to those of fresh and less control than other treatments ($P < 0.05$). LY294002 significantly inhibited the activation of primordial follicle stimulated by α -MEM + and 10 μ M kaempferol and reduced pAKT expression. Already in Chapter 2, the percentage of normal follicles was higher ($P < 0.05$) in AO medium compared to other treatments and similar ($P > 0.05$) to α -MEM supplemented with 1 or 10 μ M kaempferol. In addition, α -MEM plus 1 or 10 μ M kaempferol and AO medium showed follicular diameters, fully grown oocytes and similar GSH levels ($P > 0.05$). The den formation was higher ($P < 0.05$) in α -MEM + 1 μ M kaempferol than in AO and similar ($P > 0.05$) α -MEM + 10 μ M kaempferol. In addition, α -MEM supplemented with 1 μ M kaempferol had higher ($P < 0.05$) active mitochondria levels than α -MEM + 10 μ M kaempferol and AO medium. There was no difference for meiotic recovery rates ($P > 0.05$). In conclusion, 10 μ M kaempferol promotes activation, reduces DNA fragmentation, and increases pAKT expression of ovine preantral follicles cultured *in situ*. For secondary follicles, 1 μ M of kaempferol can be used as the only antioxidant present in the base medium, replacing the addition of transferrin, selenium and ascorbic acid during *in vitro* culture and the meiotic recovery of oocytes from ovine secondary follicles.

Keywords: folliculogenesis, AKT, preantral, PI3K, antioxidant.

LISTA DE TABELAS

Páginas

Capítulo 1.

Table 1. Mean oocyte and follicular diameter (mean \pm SD) in the fresh control and after *in vitro* culture of ovine ovarian tissue in different concentrations of kaempferol. 82

Table 2. Percentage of TUNEL-positive oocytes and granulosa cells before (fresh control) and after *in vitro* culture of ovine ovarian tissue in different concentrations of kaempferol. 83

Capítulo 2.

Table 1. Meiotic stages (%) after IVM of sheep oocytes from *in vitro* grown secondary follicles after 12 days of culture in α -MEM + 1 μ M Kaempferol or in AO medium. 112

LISTA DE FIGURAS

| | Páginas |
|--|----------------|
| Figura 1. Representação esquemática do ovário mamífero. Adaptado de http://www.tarleton.edu/Departments/anatomy/ovary.html | 21 |
| Figura 2. Classificação dos folículos pré-antrais e antrais. Folículo primordial (A), de transição (B), primário (C), secundário (D) terciário (E) e pré-ovulatório (F). N: Núcleo, O: oócito, G: células da granulosa, ZP: zona pelúcida, CT: células da teca, A: antro. (Adaptado de Silva et al., 2004). | 23 |
| Figura 3. Representação esquemática dos processos de foliculogênese e oogênese (ROSSETO et al., 2013). | 25 |
| Figura 4. Interações entre a vasculatura local e os folículos ovarianos. As setas representam a interação entre fatores de crescimento, nutrientes e oxigênio (FENG et al., 2018). | 26 |
| Figura 5. Tipos de cultivo <i>in vitro</i> de folículos ovarianos (Adaptado de ROSSETO, 2013). | 29 |
| Figura 6. Receptores de tirosina-quinases (RTKs) e receptores acoplados à proteína G (GPCRs) para PI3K-IA e PI3K-IB, respectivamente. (Adaptado de MABUCHI et al., 2015) | 32 |
| Figura 7. Componentes da via de sinalização PI3K/AKT e algumas das suas respectivas funções (Adaptado de KENNA et al., 2018) | 33 |
| Figura 8. Classificação esquemática de metabólitos secundários (Adaptado de ZAYNAB et al., 2018). | 41 |

Figura 9. Estrutura química geral dos flavonoides (Retirado de SIMÕES et al., 2010) 42

Figura 10. Estrutura química do kaempferol (Retirado de CALDEIRON MONTANO et al., 2011) 43

Figura 11. Planta (A), caule (B) e folhas (C) da *Amburana cearensis* (Adaptado de LEAL et al., 2013). 44

Figura 12. Mecanismo de ação do kaempferol (Adaptado de LIAO et al., 2016). 45

Figura 13. Kaempferol e a via de sinalização PI3K/AKT (Adaptado de LIN et al., 2018). 46

Figura 14. Esquema ilustrativo da ação direta do kaempferol nas mitocôndrias (Adaptado de KASHYAP et al., 2017). 47

Capítulo 1.

Figure 1. Histological sections of ovine ovarian fragments (A-C): normal follicles in the fresh control (A) and after *in vitro* culture in medium containing 10 μ M kaempferol (B), and atretic follicles after *in vitro* culture in α -MEM+ (C). O: oocyte; GC: granulosa cells; Asterisk: pyknotic nucleus; Arrow: retracted oocyte. Scale bar: 20 μ m (400x). Percentages of ovine morphologically normal follicles (D) in the fresh control and after 7 days of *in vitro* culture in α -MEM+ or in different concentrations of kaempferol. *Differs significantly from the fresh control ($P < 0.05$). (A,B) Different letters denote significant differences among treatments ($P < 0.05$). 84

Figure 2. Histological sections of ovine ovarian fragments (A-C): normal primordial follicles (A and B - above); normal growing follicles: 85

intermediate (B - bellow) and primary (C) follicles. O: oocyte; GC: granulosa cells; Arrow: cuboidal granulosa cell in the intermediate follicle. Scale bar: 20 μm (400x). Percentages of primordial (D) and growing (E) follicles in the fresh control and after 7 days of *in vitro* culture in $\alpha\text{-MEM+}$ or in different concentrations of kaempferol. *Differs significantly from the fresh control ($P<0.05$). (A,B,C) Different letters denote significant differences among treatments ($P<0.05$).

Figure 3. Immunohistochemical detection of PCNA (A-D) in the fresh control (A), $\alpha\text{-MEM+}$ (B), in medium containing 10 μM Kaempferol (C), and negative control (D). O: Oocyte; GC: Granulosa cells; Asterisk: PCNA-positive cell. Scale bars: 30 μm . Percentages of PCNA-positive cells in the fresh control and after *in vitro* culture in $\alpha\text{-MEM+}$ or in different concentrations of kaempferol. *Differs significantly from the fresh control ($P<0.05$). (A,B) Different letters denote significant differences among treatments ($P<0.05$). 86

Figure 4. Detection of DNA fragmentation in sheep preantral follicles after TUNEL staining: normal follicle cultured in 10 μM kaempferol (A), follicular cells with DNA fragmentation (in brown) after culture in $\alpha\text{-MEM+}$ (B), and negative control of the reaction (C). O: oocyte; GC: granulosa cells. Scale bar: 20 μm (400x). 87

Figure 5. Percentages (mean \pm SEM) of morphologically normal follicles in the fresh control, after *in vitro* culture in $\alpha\text{-MEM+}$ or in 10 μM kaempferol in the absence or presence of LY294002 (PI3K inhibitor). *Differs significantly from the fresh control ($P<0.05$). 88

Figure 6. Immunohistochemical expression of pAKT in the sheep ovary. Follicles cultured in $\alpha\text{-MEM+}$ (A) or in 10 μM kaempferol (B) in the absence of LY294002; positive control in canine mammary tumor (C); follicles cultured in $\alpha\text{-MEM+}$ (D) or in 10 μM kaempferol (E) in the presence of LY294002; negative control in the ovary (F) and in 89

mammary tumor (G). O: Oocyte; GC: Granulosa cells. Scale bars: 25 and 100 μm (400x).

Figure 7. Percentages of normal primordial (A) and growing (B) follicles in the fresh control, after 7 days of *in vitro* culture in α -MEM+ or in 10 μM kaempferol in the absence or presence of LY294002 (PI3K inhibitor). *Differs significantly from fresh control ($P < 0.05$). (A,B,C) Different letters denote significant differences among treatments ($P < 0.05$). 90

Capítulo 2.

Figure 1 - General experimental protocol for *in vitro* culture of sheep secondary follicles in different media (α -MEM or AO) without or with different concentrations of kaempferol (0.1, 1 or 10 μM). 113

Figure 2 - Morphologically normal secondary follicle at day 0 (A); antral follicle after 6 days of culture in α -MEM + 1 μM kaempferol (B) and atretic follicle after 6 days of culture in AO + 1 μM kaempferol (C). GC: granulosa cells; O: oocyte. Arrow: antral cavity. Scale bar: 100 μm . 114

Figure 3 - Percentages of morphologically normal follicles cultured in different media (α -MEM or AO) without or with different concentrations of kaempferol (0.1, 1 or 10 μM). 115

(A, B, C) Different letters denote significant differences among treatments in the same period ($P < 0.05$); (a, b, c) Different letters denote significant differences among culture periods in the same treatment ($P < 0.05$).

α -MEM: antioxidant free-medium; AO: medium containing antioxidants

Figure 4 - Percentages of antrum formation in follicles cultured in different media (α -MEM or AO) without or with different concentrations of kaempferol (0.1, 1 or 10 μM). 116

(A, B, C) Different letters denote significant differences among treatments in the same period ($P < 0.05$); (a, b, c) Different letters denote significant differences among culture periods in the same treatment ($P < 0.05$).

α -MEM: antioxidant free-medium; AO: medium containing antioxidants

Figure 5 - Follicular diameter (μm) during culture in different media (α -MEM or AO) without or with different concentrations of kaempferol (0.1, 1 or 10 μM). 117

(A, B, C) Different letters denote significant differences among treatments in the same period ($P < 0.05$); (a, b, c) Different letters denote significant differences among culture periods in the same treatment ($P < 0.05$).

α -MEM: antioxidant free-medium; AO: medium containing antioxidants

Figure 6 - Percentages of fully grown oocytes after culture of secondary follicles in different media (α -MEM or AO) without or with different concentrations of kaempferol (0.1, 1 or 10 μM). 118

(A, B, C) Different letters denote significant differences among treatments ($P < 0.05$).

α -MEM: antioxidant free-medium; AO: medium containing antioxidants

Figure 7 - Epifluorescent photomicrographic images of ovine oocytes showing intracellular levels of GSH (A, B, C), active mitochondria (D, E, F) and (G) Intracellular levels of GSH and active mitochondria in oocytes from different experimental groups. Scale bars: 50 μm (100x). 119

(A, B) Bars with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

α -MEM: antioxidant free-medium; AO: medium containing antioxidants.

Figure 8- Chromatin configuration of ovine oocytes stained with Hoechst 33342 after IVM. Oocytes in GV (A), GVBD (B) and MI (C) from *in vitro* grown secondary follicles in α -MEM + 1 μM kaempferol. Scale bars: 50 μm . 120

LISTA DE ABREVIACOES

A: Antro

AKT: Proteína quinase B

ALK5: Receptor de ativina tipo quinase 5

APAF-1: Protease associada à apoptose-1

ATP: Adenosina tri-fosfato

BMP-15: Proteína morfogenética óssea-15

BMPR: Receptor de proteína morfogenética óssea

BSA: Albumina sérica bovina

CCO: Complexo cumulus-oócito

CGP: Células germinativas primordiais

CO₂: Dióxido de Carbono

DAB: Diaminobenzidina

DNA: Ácido desoxorribonucleico

EGF: Fator de crescimento epidermal

ERO: Espécie reativa de oxigênio

FGF-2: Fator de crescimento fibroblástico-2

FOXO: Forkhead transcription factors

FSH: Hormônio folículo estimulante

GC: Células da granulosa

GDF-9: Fator de crescimento e diferenciação-9

GH: Hormônio do crescimento

GSH: Glutationa

GV: vesícula germinativa

GVBD: quebra da vesícula germinativa

IGF-I: Fator de crescimento semelhante à insulina-I

KL: Kit ligand

LH: Hormônio luteinizante

MI: Metáfase I

MII: Metáfase II

MAPK: proteína ativadora mitogênica quinase

MEM: meio essencial mínimo

MIV: Maturação *in vitro*

mTOR: via da rapamicina mamífera

NADPH oxidase: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase

O: Oócito

pAKT: Proteína quinase B fosforilada

PBS: Solução fosfato salina tamponada

PCNA: Antígeno nuclear de proliferação celular

PI3K: Fosfatidilinositol 3 quinase

PIP-2: Fosfatidilinositol-bi-fosfato

PIP-3: Fosfatidilinositol-tri-fosfato

T4: Tiroxina

TC: Células da teca

TCM-199: Meio de cultivo de tecido-199

TGF- β : Fator de crescimento e transformação- β

TNF: Fator de necrose tumoral

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| RESUMO | 8 |
| ABSTRACT | 9 |
| LISTA DE TABELAS | 10 |
| LISTA DE FIGURAS | 11 |
| LISTA DE ABREVIACÕES | 16 |
| 1. INTRODUÇÃO | 19 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 21 |
| 2.1. Ovário mamifero..... | 21 |
| 2.2. Classificação dos folículos ovarianos e foliculogênese | 22 |
| 2.3. População e atresia folicular | 26 |
| 2.4 Sistemas de cultivo <i>in vitro</i> de folículos ovarianos | 28 |
| 2.4.1. Cultivo <i>in situ</i> e ativação de folículos primordiais | 30 |
| 2.4.1.2. Via de sinalização PI3K / AKT | 31 |
| 2.4.2. Cultivo <i>in vitro</i> de folículos ovarianos isolados | 35 |
| 2.5. Estado atual do cultivo <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais..... | 36 |
| 2.6. Importância da composição do meio de cultivo <i>in vitro</i> | 36 |
| 2.7. Estresse oxidativo e antioxidantes no meio de cultivo folicular | 37 |
| 2.8. Metabólitos secundários..... | 40 |
| 2.8.1. Flavonóides | 42 |
| 2.8.1.1. Kaempferol | 43 |
| 3. JUSTIFICATIVA | 49 |
| 4. HIPÓTESES..... | 50 |
| 5. OBJETIVOS | 51 |
| 6. CAPÍTULO 1 | 52 |
| 7. CAPÍTULO 2 | 91 |
| 8. CONCLUSO..... | 121 |
| 9. PERSPECTIVAS..... | 122 |
| 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 123 |
| 11. ANEXOS | 148 |

1. INTRODUÇÃO

O rebanho de ovinos apresenta um efetivo de 18,4 milhões de animais no Brasil, sendo 64,2% destes na região Nordeste (IBGE, 2017). Tendo em vista que a ovinocultura desempenha importante papel socioeconômico por se tratar de importante fonte de alimento e renda, o estabelecimento de biotécnicas reprodutivas irá contribuir para ampliação do conhecimento básico em fisiologia reprodutiva (CASTILHO et al., 2013), permitir a multiplicação do germoplasma desses animais e servir como base para o entendimento de algumas doenças, como a infertilidade (MBEMYA et al., 2017).

Nesse sentido, dentre as biotecnologias da reprodução de fêmeas, destaca-se o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais, que visa criar *in vitro* as condições necessárias para promover o completo desenvolvimento de folículos ovarianos (HOSSEINI et al., 2017) e, conseqüentemente, proporcionar a obtenção de oócitos fertilizáveis destinados, por exemplo, a técnicas de reprodução assistida (CADENAS et al., 2018). Até o momento, o resultado mais promissor oriundo do cultivo *in vitro* folicular demonstrou que é possível obter o nascimento de crias vivas a partir do crescimento e da maturação *in vitro* de oócitos oriundos de folículos pré-antrais de animais de laboratório (O'BRIEN et al., 2003). Contudo, em espécies domésticas, como a caprina (SARAIVA et al., 2010) e a ovina (ARUNAKUMARI & RAO, 2010), poucos embriões foram produzidos *in vitro* após o cultivo de folículos secundários.

Desse modo, o maior desafio dos pesquisadores é o desenvolvimento de um meio de cultivo *in vitro* ideal que assegure o completo desenvolvimento folicular (FIGUEIREDO et al., 2008). Nessa perspectiva, estudos demonstram que diferentes substâncias, como fatores de crescimento (AGUIAR et al. 2017), hormônios (SILVA et al., 2017) ou ainda antioxidantes (LINS et al., 2017) vêm sendo testados. Sabe-se que a adição de antioxidantes ao meio de cultivo reduz a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), evitando assim, o estresse oxidativo durante o cultivo *in vitro* (SÁ et al., 2017). Além disso, o antioxidante pode promover o desenvolvimento folicular do estágio de secundário para antral (MENEZES et al., 2017), etapa essencial para o

desenvolvimento folicular. Dentre as substâncias antioxidantes, destaca-se o kaempferol, que ainda não foi estudado na foliculogênese ovariana ovina.

O kaempferol é um flavonóide natural presente em inúmeras plantas comestíveis e que já foi estudado devido as suas propriedades antioxidante (CALDERON-MONTANO et al., 2011), antiapoptótica em células estaminais mesenquimais derivadas da medula óssea em coelho (ZHU et al., 2017) e citoprotetora contra cardiotoxicidade induzida por doxorubicina em rato (XIAO et al., 2012). Com relação à reprodução, esse flavonóide restaurou a motilidade de espermatozoides humanos, expostos previamente ao alumínio (JAMALAN et al., 2016) e aumentou a porcentagem de embriões suínos em estágio de mórula, quando adicionado ao meio de maturação *in vitro* (ORLOVSCHI et al., 2014). No entanto, o efeito dessa substância sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos ovarianos ovinos ainda não foi estudado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O ovário mamífero

O ovário mamífero (Figura 1) é o principal órgão do sistema reprodutivo de fêmeas, sendo composto por folículos ovarianos juntamente com o corpo lúteo, o tecido intersticial e vários tipos de células diferenciadas que trabalham em conjunto para promover suas funções endócrina e exócrina. Com relação à função endócrina, o ovário é responsável pela síntese e secreção de hormônios que são essenciais para o desenvolvimento folicular, ciclicidade estral/menstrual e manutenção do trato reprodutivo e suas funções. A função exócrina ou gametogênica visa à diferenciação e à liberação de um oócito maduro para fecundação (FENG et al., 2018; MCGEE E HSUEH, 2000).

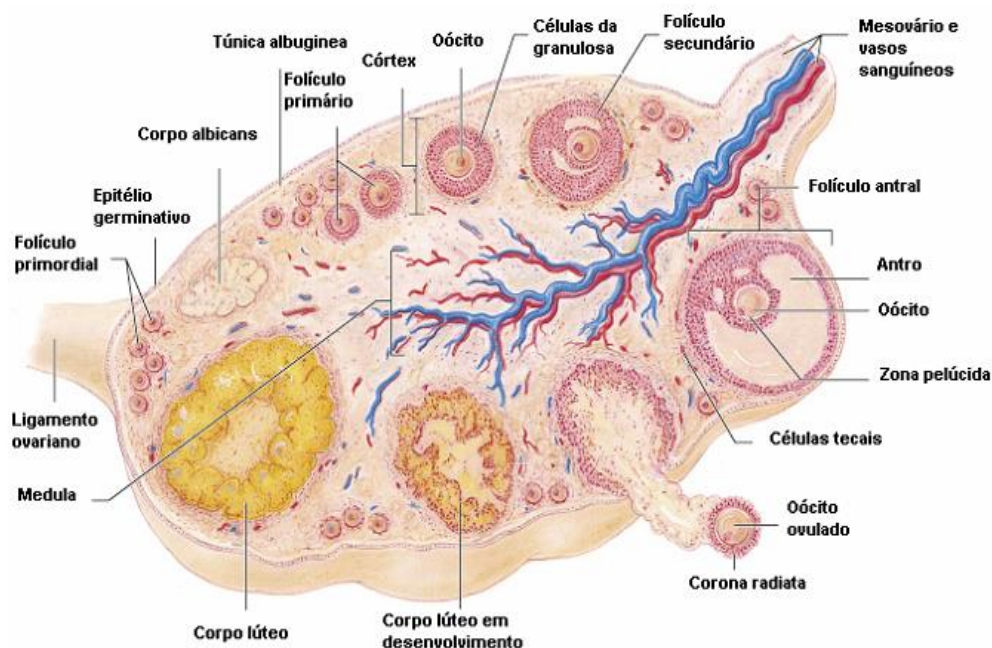


Figura 1. Representação esquemática do ovário mamífero. Adaptado de <http://www.tarleton.edu/Departments/anatomy/ovary.html>.

Em todas as espécies mamíferas, o ovário é composto de duas regiões distintas: uma medular e outra cortical, circundada pelo epitélio germinativo (BAILLET et al., 2012). Na maioria das espécies, a medula está localizada mais

internamente e consiste de um arranjo irregular de tecido conjuntivo fibroelástico e um extensivo tecido nervoso e vascular que chega ao ovário através do hilo. O córtex ovariano, localizado mais externamente, consiste na região funcional do órgão, sendo composto de tecido conjuntivo (fibroblastos, colágeno e fibras reticulares), folículos ovarianos em vários estádios de desenvolvimento ou em regressão, bem como corpos lúteos, albicans e hemorrágicos (RICHARDS & PANGAS, 2010).

A funcionalidade deste órgão durante a vida reprodutiva das fêmeas depende da perfeita interação entre fatores intra-ovarianos, autócrinos, parácrinos e endócrinos (ALVES et al., 2012), bem como entre a vasculatura local e os folículos nos mais variados estágios de desenvolvimento que atuam coordenando o processo da foliculogênese ovariana (FENG et al., 2018).

2.2. Classificação dos folículos ovarianos e foliculogênese

O folículo ovariano é a unidade morfofuncional do ovário e é formado por um oócito circundado por células da granulosa e/ou tecais (HE & TOH, 2017) que proporcionam as condições ideais para a manutenção da viabilidade, crescimento e liberação de um oócito maturo no processo de ovulação (KNIGHT; GLISTER, 2006; NILSSON et al., 2011). Assim, uma alteração em qualquer etapa deste processo complexo pode comprometer a fertilidade (CONTI et al., 2012).

A foliculogênese pode ser definida como um processo cíclico responsável pela formação, maturação e liberação de oócitos dos ovários (LAISK-PODAR et al., 2016), iniciando-se com a formação do folículo primordial e culminando com o estágio de folículo de *De graaf* ou pré-ovulatório (MONNIAUX, 2016). A capacidade reprodutiva de uma fêmea mamífera é iniciada durante a vida fetal, momento em que ocorre a formação folicular (BAILLET et al., 2012). Nesse sentido, de acordo com o grau de evolução, os folículos podem ser divididos em: 1) folículos pré-antrais ou não cavitários, que abrangem os folículos primordiais, de transição, primários e secundários e 2) folículos antrais ou cavitários, compreendendo os folículos terciários e *De graaf* ou pré-ovulatório (Figura 2; ROSSETO et al., 2013; SILVA et al., 2004).

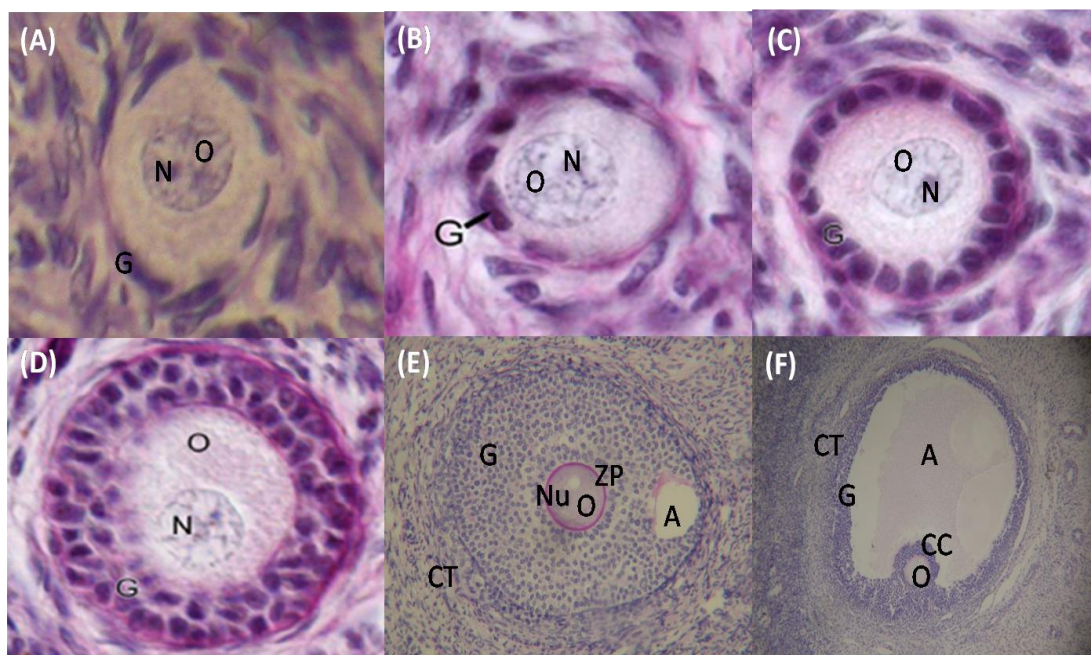


Figura 2. Classificação dos folículos pré-antrais e antrais. Folículo primordial (A), de transição (B), primário (C), secundário (D) terciário (E) e pré-ovulatório (F). N: Núcleo, O: oócito, G: células da granulosa, ZP: zona pelúcida, CT: células da teca, A: antro. (Adaptado de Silva et al., 2004).

O folículo primordial ou folículo quiescente (WEAR et al., 2016) é composto por um oócito, que se encontra na fase de diplóteno da prófase I, circundado por uma única camada de células da pré-granulosa de morfologia pavimentosa (MONNIAUX, 2016). Em ruminantes e primatas, a formação de folículos primordiais, os quais representam 95% do total de folículos pré-antrais presentes no ovário, começa durante o desenvolvimento fetal e, mais especificamente em ovinos, ocorre após 100 dias de gestação (FORTUNE et al., 2000; SMITZ; CORTVRINDT, 2002).

A ativação ou início do crescimento folicular é um processo que se dá pela passagem dos folículos primordiais do *pool* de reserva (quiescentes) para o *pool* de folículos em crescimento (transição, primário, secundário, terciário e pré-ovulatório), ou seja, refere-se ao passo inicial no processo complexo de crescimento do oócito e diferenciação das células da pré-granulosa (WEAR et al., 2016). Esse processo é independente de gonadotrofinas (VABRE et al.,

2017). A ativação dos folículos primordiais é caracterizada pela mudança na morfologia e aumento das células da granulosa, seguida do aumento do diâmetro oocitário (MONNIAUX, 2016). Após a ativação, os folículos primordiais gradualmente adquirem células da granulosa com morfologia pavimentosa e cúbica, tornam-se folículos de transição e, em seguida, folículos primários, ou seja, quando são circundados por uma camada de células da granulosa cúbicas (SILVA et al., 2004).

Estudos *in vitro* demonstraram evidências de que a ativação de folículos primordiais ovinos pode ser influenciada, entre outros fatores, por: kit-ligand (KL) (CAVALCANTE et al., 2016), fator de crescimento epidermal (EGF) (SANTOS et al., 2017), fator de crescimento semelhante a insulina-1 (IGF-I) (BEZERRA et al., 2018), GDF-9 (MARTINS et al., 2008), fator de crescimento fibroblástico-2 (FGF-2) (SANTOS et al., 2014), hormônio do crescimento (GH) (MAGALHÃES et al., 2011) e a proteína morfogenética-15 BMP-15 (CELESTINO et al., 2011).

A multiplicação das células da granulosa dos folículos primários leva à formação de várias camadas de células ao redor do oócito, formando os folículos secundários. Estes folículos são caracterizados pela presença de duas ou mais camadas de células da granulosa cúbicas localizadas em torno do oócito, bem como pela formação de uma camada de células tecais envolvendo a membrana basal folicular (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Nestes, a zona pelúcida é claramente identificada ao redor do oócito (LUCCI et al., 2001). Nessa fase, inicia-se a formação das camadas de células da teca a partir de células do estroma intersticial. Sendo assim, a camada de células tecais se estratifica e se diferencia em duas partes distintas: teca externa e teca interna (RIZOV et al., 2017).

Com o crescimento dos folículos secundários e a organização das células da granulosa em várias camadas, ocorre a formação de uma cavidade repleta de líquido folicular, entre as camadas de células granulosa, denominada antro. A partir deste estágio, os folículos passam a ser denominados terciários ou antrais. O diâmetro dos folículos aumenta devido ao crescimento do oócito, multiplicação das células da granulosa, da teca e aumento do fluido antral. As gonadotrofinas FSH e LH são liberadas na glândula pituitária e controlam

principalmente os processos de desenvolvimento folicular e ovulação, regulando, em parte, a produção de estrogênio e as funções das células da granulosa e da teca (Figura 3; JIANG et al., 2017; VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

Na espécie ovina, diversos fatores de crescimento e hormônios contribuem para o desenvolvimento de folículos secundários *in vitro*, como por exemplo, IGF-I, fator de crescimento transformante beta (TGF β), hormônios tetraiodotironina (T4), hormônio do crescimento (GH) e hormônio folículo estimulante (FSH) (ARUNAKUMARI et al. 2010).

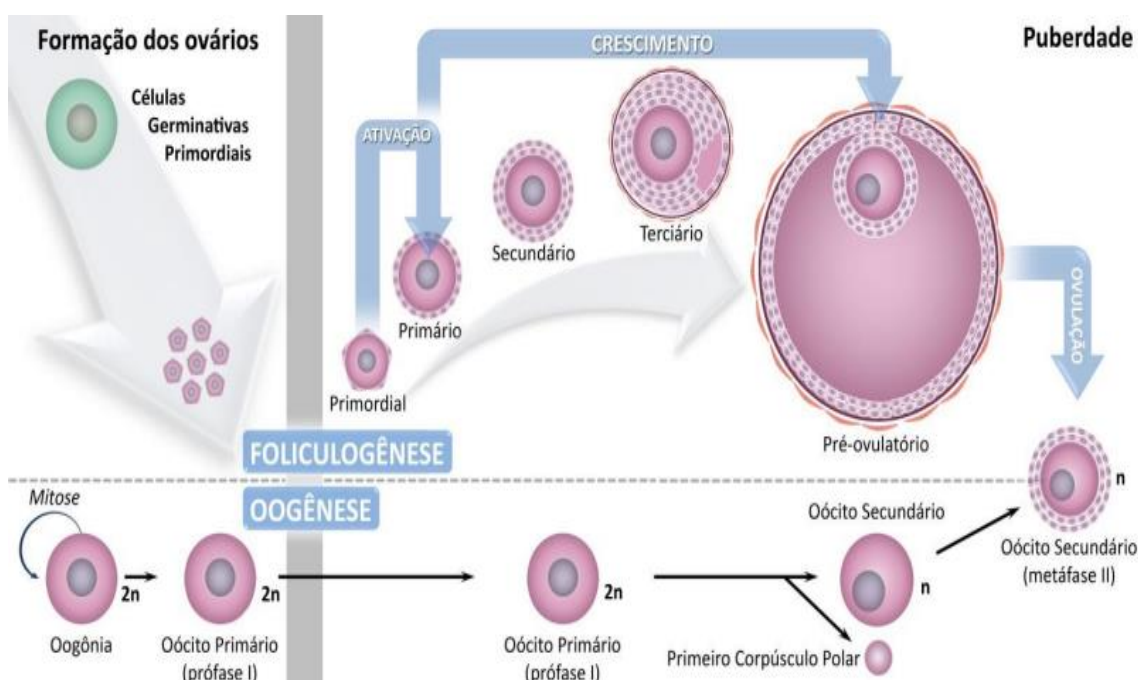


Figura 3. Representação esquemática dos processos de foliculogênese e oogênese (ROSSETO et al., 2013).

Vale ressaltar que os folículos em crescimento estão em contínua interação também com a vasculatura local ovariana (Figura 4). Portanto, os folículos ovarianos secretam fatores angiogênicos locais (fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento fibroblástico básico (FGF β), angiopoietina, entre outros, que atuam em conjunto para promover suprimento vascular para os folículos vizinhos, aumento da concentração de hormônios gonadotróficos (GnHs), nutrientes e oxigênio desencadeando assim o crescimento folicular (FENG et al., 2018).

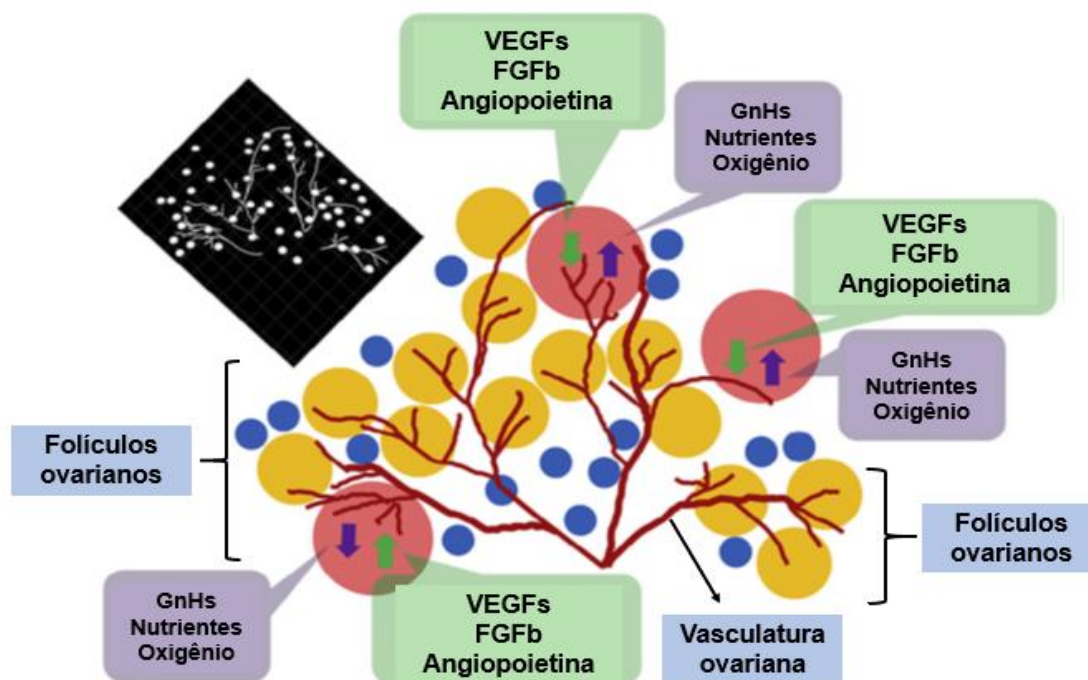


Figura 4. Interações entre a vasculatura local e os folículos ovarianos. As setas representam a interação entre fatores de crescimento, nutrientes e oxigênio (FENG et al., 2018).

No último estágio do desenvolvimento folicular, forma-se o folículo pré-ovulatório, o qual é caracterizado por um oócito circundado por células da granulosa especializadas que são denominadas de células do *cumulus*. As células da granulosa de folículos pré-ovulatórios param de se multiplicar em resposta ao hormônio luteinizante (LH) e iniciam a etapa final de diferenciação. Desta forma, nessa fase, ocorre uma diminuição dos níveis circulantes de FSH em resposta ao alto nível de estradiol e inibina produzidos pelo folículo. Com o pico pré-ovulatório de LH durante a puberdade, o oócito retoma a meiose e progride da prófase I para a metáfase II, resultando na ovulação de um oócito maduro (MONNIAUX, 2016).

2.3. População e atresia folicular

Os folículos pré-antrais representam 90% do total de folículos presentes no ovário e constituem o estoque de gametas femininos (FIGUEIREDO et al.,

2008). A população folicular difere entre as espécies, além de ser observada uma grande variação individual (KATSKA-KSIAZKIEWICZ, 2006). Na espécie ovina, podem ser encontrados cerca de 160.000 folículos ovarianos (DRIANCOURT et al., 1991). Apesar desta grande população folicular presente no ovário mamífero, a quase totalidade dos folículos, ou seja, 99,9%, não chegam à ovulação, pois morrem por um processo fisiológico denominado atresia, o qual ocorre, principalmente, por via apoptótica ou pelo processo degenerativo de necrose (FIGUEIREDO et al., 2008).

A apoptose é a principal responsável pela perda da reserva folicular ovariana (GOUGEON, 2010). Refere-se a um processo fisiológico de morte celular programada e desempenha um papel relevante na homeostase de diferentes tecidos em resposta a numerosos estímulos. Ela é caracterizada por diversas alterações morfológicas e bioquímicas nas células, tais como: modificações no citoesqueleto (ORRENIUS et al., 2013), que induzem contração celular, fragmentação do ácido desoxirribonucléico (DNA) e condensação da cromatina, levando ao aparecimento de núcleos picnóticos, formação de vesículas, porém, sem perda de integridade da membrana e sem resposta inflamatória (LAVIN, 1993; LIAO et al., 2005; YASUHARA et al., 2003). Existem moléculas envolvidas no controle das vias de ativação da apoptose, dentre estas, estão as proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007), que podem ser ativadas por duas vias principais: a via extrínseca ou via do receptor de morte e pela via intrínseca ou via mitocondrial (SILVA et al, 2013).

A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos aos receptores Fas, membros da superfamília dos receptores do fator de necrose tumoral (rTNF). Esta ligação é capaz de ativar a cascata das caspases (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). Inicialmente, são ativadas as caspases iniciadoras (caspase-8 e 9), que ativam as caspases executoras, tais como a caspase-3 e caspase-7 (JIANG; WANG, 2004), responsáveis pela clivagem de proteínas essenciais, conduzindo à morte celular (HUTT, 2015). Por sua vez, a via intrínseca é ativada por estresses diversos, como a privação de fatores de crescimento, danos ao DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes. Estes sinais são conduzidos até as mitocôndrias, as quais liberam moléculas

pró-apoptóticas, como o citocromo c, no citoplasma (DESAGHER; MARTINOU, 2000; HENGARTNER, 2000), estimulando a ativação das caspase-9 e caspase-3 (RUPNARAIN et al., 2004) e, conseqüentemente, a apoptose celular.

A necrose, por sua vez, é um termo usado para as mortes celulares acidentais, produzidas, por exemplo, por traumatismos ou substâncias tóxicas, resultando em rápida desregulação da homeostasia celular (BRAS et al., 2005). Durante a necrose, ocorre condensação da cromatina, a célula aumenta de volume, as mitocôndrias dilatam-se e, dessa forma, são danificadas juntamente com o retículo endoplasmático e há desagregação dos ribossomos (UCHIYAMA, 1995; ORRENIUS et al., 2013).

Por fim, apesar de vários estudos sobre os folículos pré-antrais e mecanismos envolvidos na atresia folicular, os dados obtidos até o momento não nos permitem criar um ambiente *in vitro* ideal para produzir um desenvolvimento folicular semelhante ao observado no ovário. Provavelmente por causa disso, os sistemas de cultivo e composições de meio não são capazes de sustentar a sobrevivência da maioria dos folículos e, conseqüentemente, fornecem poucos oócitos em metáfase II (AMORIM, 2018).

2.4. Sistemas de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos

O desenvolvimento de sistemas de cultivo *in vitro* a partir de folículos primordiais até a obtenção de oócitos em metáfase II (MII), que posteriormente possam ser utilizados eficazmente para fecundação *in vitro* (FIV), seria um avanço importante na medicina reprodutiva, especialmente para o crescente número de mulheres que sobrevivem ao câncer, mas enfrentam a infertilidade devido aos efeitos do seu tratamento (BERTOLDO et al., 2018).

Nesse sentido, o cultivo *in vitro* de folículos vem sendo utilizado para promover o completo desenvolvimento de folículos ovarianos (HOSSEINI et al., 2017) e, conseqüentemente, proporcionar a obtenção de oócitos fertilizáveis destinados, por exemplo, a técnicas de reprodução assistida (CADENAS et al., 2018). Além disso, o cultivo de folículos tem sido considerado uma estratégia promissora para combater a infertilidade em mulheres (HE & TOH, 2017),

sobretudo porque a medida que as mulheres envelhecem, a qualidade dos oócitos é reduzida e a reserva de folículos primordiais é esgotada (REGAN et al., 2017). Essa técnica possibilita, ainda, maximizar o potencial reprodutivo de animais domésticos, especialmente aqueles geneticamente superiores, bem como minimizar a perda oocitária observada *in vivo* (ARAUJO et al., 2014; HAAG et al., 2013; NANDI et al., 2017; XU et al., 2013).

Nesse sentido, o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais pode possibilitar que os oócitos imaturos inclusos nestes folículos tornem-se maduros e aptos à fecundação *in vitro* (FIGUEIREDO et al., 2008), evitando a atresia folicular (GUZEL & OKTEM, 2017). Essa biotecnologia vem sendo desenvolvida na tentativa de: 1) evitar a atresia e elucidar os mecanismos envolvidos na regulação da foliculogênese inicial; 2) fazer testes *in vitro* da ação (benéfica ou tóxica) de fármacos; 3) produzir bancos genéticos (germoplasma); 4) aperfeiçoar a reprodução assistida de humanos e animais (FIGUEIREDO et al., 2007; LIMA et al., 2016).

Dessa forma, utilizando essa biotécnica, vários sistemas de cultivo *in vitro* foram desenvolvidos nas últimas décadas e os resultados obtidos são dependentes do tipo de meio, concentração, tipo da substância, como por exemplo: hormônio (SILVA et al., 2017), fator de crescimento (AGUIAR et al. 2017), antioxidante (LINS et al., 2017), sistema de cultivo utilizado e da espécie animal investigada (ZOHEIR et al., 2017; ZHENG et al., 2018). Finalmente, destaca-se que o folículo ovariano pode ser cultivado de duas maneiras: inclusos em fragmentos do córtex ovariano (*in situ*) ou de forma isolada (Figura 5).

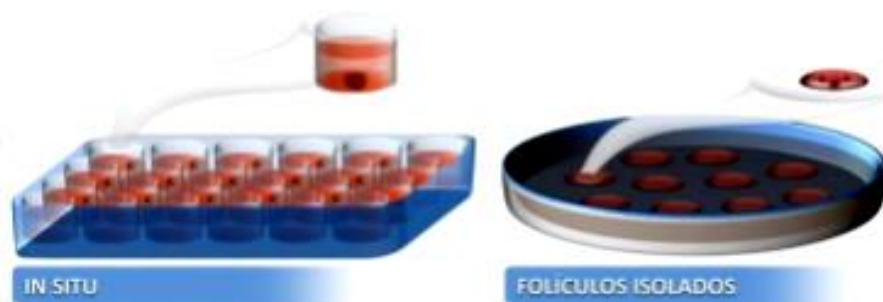


Figura 5. Tipos de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos (Adaptado de ROSSETO, 2013).

2.4.1. Cultivo *in situ* e ativação de folículos primordiais

O cultivo de tecido ovariano (*in situ*) é realizado com o objetivo de estudar a ativação do folículo primordial (SILVA et al., 2016), identificar os caminhos de sinalização no ovário que mantêm a quiescência do folículo, permitindo a manipulação farmacológica, através de inibidores das vias de sinalização da ativação folicular (ZHAO et al., 2017) e, conseqüentemente, promover o posterior crescimento folicular *in vitro* (GUZEL & OKTEM, 2017). Um estudo recente mostrou que o cultivo de fragmentos do córtex ovariano representa uma excelente ferramenta para entender melhor a biologia reprodutiva e testar os efeitos de várias drogas sobre o crescimento folicular ovariano (GUZEL, 2018).

Diante disso, muitos pesquisadores têm buscado estudar os mecanismos que controlam o início do crescimento folicular, processo conhecido como ativação. Um estudo recente destacou que o controle da ativação de folículos primordiais fornece basicamente duas estratégias: 1) aumenta o pool de folículos em crescimento, resultando em maior disponibilidade de oócitos para o tratamento da infertilidade para pacientes com insuficiência ovariana prematura ou aqueles que respondem fracamente a estimulação ovariana. Por outro lado, 2) a supressão dos folículos primordiais é uma estratégia potencial para preservar o estoque de oócitos em mulheres que desejam engravidar tardiamente. A estratégia 2 é baseada na teoria de que mais folículos primordiais serão preservados para o futuro (ZHENG et al., 2018).

Em roedores, a pequena dimensão dos ovários possibilita o cultivo do órgão inteiro, o que tem sido bastante útil para o estudo da foliculogênese inicial em pequenos mamíferos (O'BRIEN; EPPIG, 2003). Por outro lado, em animais domésticos de médio e grande porte, devido às grandes dimensões dos ovários, este modelo torna-se inviável. Nestes animais, o cultivo de pequenos fragmentos do córtex ovariano (cultivo *in situ*) tem sido realizado para o estudo da ativação de folículos primordiais e posterior crescimento folicular em diferentes espécies, incluindo ovinos (BEZERRA et al., 2018), caprinos (DIPAZ-BERROCAL et al., 2017), bovinos (SILVA et al., 2017), humanos (LANDE et al., 2017) e babuínos (WANDJI et al., 1997). Além da praticidade, o cultivo *in situ*

tem a vantagem de manter o contato celular (ABIR et al., 2006) e a integridade tridimensional dos folículos, fornecendo um complexo sistema de suporte que se assemelha ao ovário *in vivo* (PICTON et al., 2008). No entanto, neste tipo de sistema, embora haja uma significativa ativação folicular, poucos folículos primários cultivados progridem até o estágio de folículo secundário (FORTUNE, 2003).

Normalmente, quando o córtex ovariano é cultivado *in vitro*, os folículos primordiais dormentes ou quiescentes são ativados e iniciam o seu crescimento (SILVA et al., 2016). No entanto, a fragmentação do tecido ovariano também pode promover a ativação folicular. Uma possível explicação para a ativação espontânea é que a fragmentação dos ovários aumenta a polimerização de actina e interrompe a via de sinalização Hippo, levando a um aumento na expressão de fatores de crescimento presentes no tecido conjuntivo, que promovem o crescimento do folículo *in vitro* (HSUEH et al., 2015).

Para um melhor entendimento sobre o processo de início do crescimento de folículos primordiais, além de um meio adequado para o cultivo *in vitro* de tecido ovariano, é importante estudar as vias de sinalização intracelular e como elas podem regular os processos reprodutivos, especialmente, a ativação folicular. Dentre as vias de sinalização de ativação do folículo primordial, merece destaque a via fosfatidilinositol-3-quinase.

2.4.1.2. Via de sinalização fosfatidilinositol-3-quinase / proteína quinase B (PI3K/AKT).

A fosfatidilinositol-3-quinase, em inglês phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K), é uma enzima pertencente à família de quinases intracelulares, que representa um componente chave dos mecanismos que controlam o crescimento e a proliferação celular. Já a proteína quinase B (AKT ou PKB) atua como um regulador crítico da fisiologia e controla diversas funções celulares, incluindo a sobrevivência, a proliferação e o metabolismo. A família da AKT é composta por três isoformas altamente homólogas, AKT1 (PKB α), AKT2 (PKB β) e AKT3 (PKB γ) (CECCONI et al., 2012; MANNING E CANTLEY, 2007; HERMIDA et al., 2017).

A ativação da via de sinalização PI3K/AKT começa através da interação entre a PI3K e o receptor de tirosina quinase ou o receptor transmembrana acoplado à proteína G (KENNA et al., 2018). Essa interação ocorre direta ou indiretamente por meio de moléculas adaptadoras tais como substratos de receptores de insulina (ZHANG et al., 2018).

Existem múltiplas isoformas da via PI3K e elas são classificadas em classes I, II, III, que têm funções distintas na sinalização celular e levam à ativação de várias vias de sinalização que regulam o metabolismo, a sobrevivência e a diferenciação celular (ORCY et al., 2008). Dentre elas, a classe mais estudada é a PI3K da classe I. Essa, por sua vez, inclui duas subclasses: PI3K - IA (PI3K α , β e δ), que são ativadas por receptores de tirosina quinase e PI3K - IB (PI3K γ), que são ativadas por receptores acoplados à proteína G. A PI3K - IA consiste de uma subunidade reguladora, chamada p85 e uma subunidade catalítica, denominada p110 (MABUCHI et al., 2015; Figura 6).

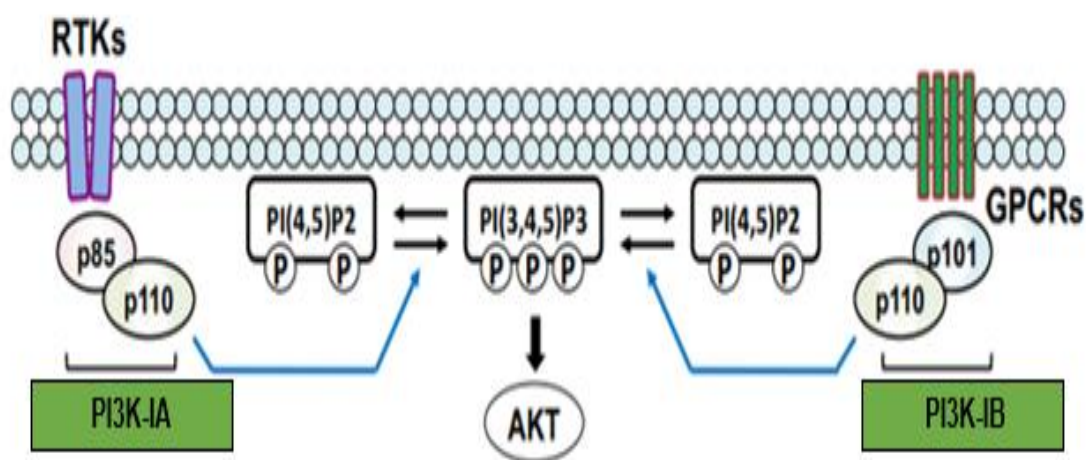


Figura 6. Receptores de tirosina-quinases (RTKs) e receptores acoplados à proteína G (GPCRs) para PI3K-IA e PI3K-IB, respectivamente. (Adaptado de MABUCHI et al., 2015)

A PI3K da classe I (Figura 7), por sua vez, possui a capacidade de fosforilar o fosfatidilinositol-bi-fosfato (PIP-2) e produzir fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). Por sua vez, o aumento de PIP3 recruta, entre outras, a proteína quinase B ou AKT, via domínio de homologia pleckstrin (JANG et al.,

2016). Isso leva ao seu recrutamento para a membrana citosólica onde se torna ativa. Uma vez ativa, a AKT pode, então, fosforilar vários substratos e regular sua atividade, incluindo glicogênio sintase quinase-3 β (GSK3 β), murino duplo minuto-2 homólogo (MDM2) e a família de fatores de transcrição FoxO (também chamado “forkhead”), aumentando assim a síntese de proteínas, a motilidade e a proliferação celular (KENNA et al., 2018).

Além desses efeitos diretos, a AKT também exerce importante efeito indireto, atuando sobre os complexos mTOR (mTORC). Embora estruturalmente semelhantes, mTORC1 e mTORC2 desempenham papéis diferentes dentro da via de sinalização PI3K (KENNA et al., 2018). Nesse sentido, a ativação de mTORC1 causa fosforilação da proteína ribossômica S6 quinase (S6K) e proteína de ligação 1 do fator de iniciação eucariótico 4 (4E-BP1) (HAY et al., 2004). Isso resulta na proliferação celular, crescimento e síntese proteica (CORNU et al., 2013). Já o mTORC2 demonstrou ter atividade de piruvato desidrogenase quinase-2 (PDK-2), fosforilando e ativando AKT (SHRIVASTAVA et al., 2018).

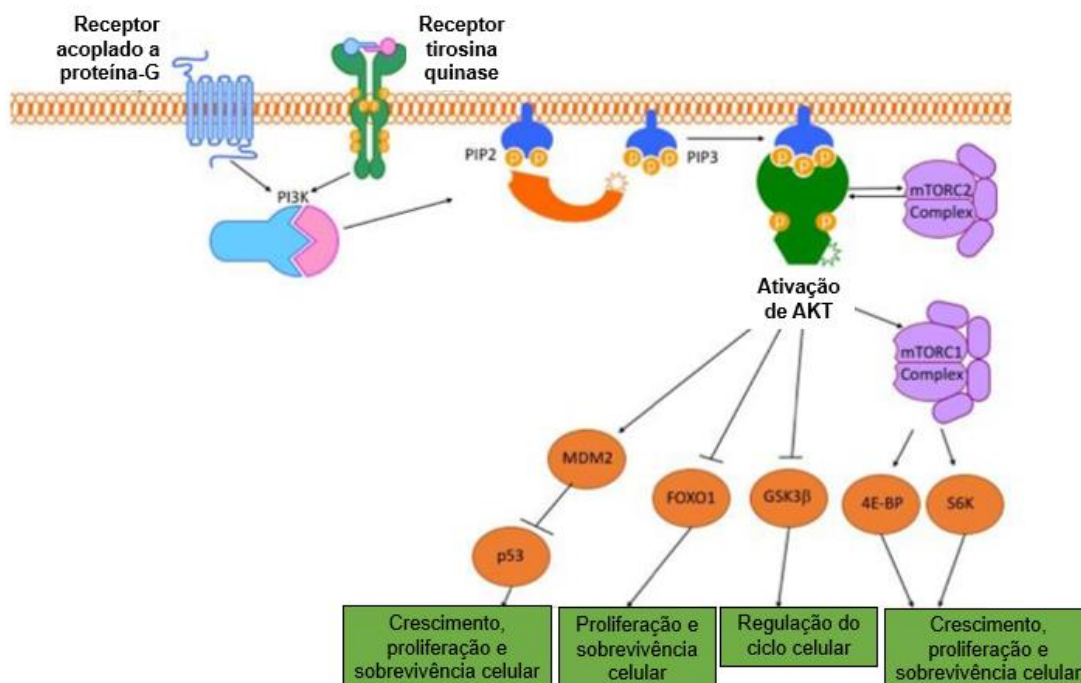


Figura 7. Componentes da via de sinalização PI3K/AKT e algumas das suas respectivas funções (Adaptado de KENNA et al., 2018)

A via PI3K/AKT é a principal via de sinalização intracelular que regula múltiplos processos biológicos, como a proliferação, diferenciação e apoptose celular sob condições fisiológicas e patológicas (OUYANG et al., 2017). Sendo assim, o papel da sinalização PI3K/AKT sobre a proliferação, sobrevivência e metabolismo celular é bem compreendido (DUPONT et al., 2013). No entanto, mais estudos são necessários para elucidar o papel da sinalização PI3K/AKT em folículos ovarianos.

Nesse sentido, é sabido que a via de sinalização PI3K/AKT é uma das vias responsáveis pela ativação de folículos primordiais (ZHOU et al., 2018). Portanto, para comprovar que essa via age na ativação folicular, alguns estudos vêm sendo desenvolvidos, utilizando inibidores farmacológicos da PI3K, a exemplo do LY294002 (BEZERRA et al., 2018). Esses estudos fornecem uma melhor compreensão da função e mecanismos regulatórios desta via na ativação folicular ovariana (BEZERRA et al., 2018; KEATING et al. 2009, SOBINOFF et al., 2012; ZHAO et al., 2017). Adicionalmente, um estudo da nossa equipe forneceu a primeira evidência direta de que a via PI3K medeia a ativação espontânea *in vitro* de folículos primordiais na espécie ovina. Porém, esse mesmo estudo destacou que o EGF pode promover a ativação folicular através de outras vias de sinalização, exceto a via PI3K (SANTOS et al., 2017). Nessa perspectiva, um estudo recente do nosso laboratório comprovou que o IGF-I promove ativação através da via PI3K/AKT na espécie ovina (BEZERRA et al., 2018). Por outro lado, ao relacionar a via PI3K/AKT com a foliculogênese, faz-se importante destacar que o balanço desta via é fundamental não apenas para ativação folicular, mas também para manutenção, crescimento e sobrevivência do pool de folículos primordiais (MONNIAUX, 2016). Entretanto, em ovinos, não existem estudos que verifiquem a hipótese de que a inibição farmacológica da ativação da via PI3K, utilizando LY294002, inibe a ativação folicular *in vitro*, especificamente, após cultivo de tecido ovariano em meio suplementado com o kaempferol.

2.4.2. Cultivo *in vitro* de folículos ovarianos isolados

O cultivo *in vitro* de folículos isolados é uma técnica que objetiva aumentar a produção de oócitos meioticamente competentes (SILVA et al., 2016). Nesse tipo de cultivo, os folículos pré-antrais são isolados e através da técnica de microdissecção, utilizando agulhas, são cultivados individualmente em gotas de meio de cultivo (CADENAS et al., 2018; GOUVEIA et al., 2016; LINS et al., 2017). Este tipo de cultivo apresenta como vantagens permitir o acompanhamento individual dos folículos durante o cultivo, além de favorecer uma maior perfusão do meio para as células foliculares (ABIR et al., 2001). No entanto, embora esse sistema de cultivo, utilizando folículos secundários, tenha demonstrado ser eficiente na produção de oócitos de alta qualidade (SILVA et al., 2017), o cultivo de folículos isolados não é tão eficaz para folículos em estágios iniciais de desenvolvimento, pois os folículos primordiais e primários estão mais propensos a perder o contato físico entre o oócito e as células da granulosa durante o cultivo *in vitro* (SHEA et al., 2014).

Além dos sistemas anteriormente descritos (*in situ* e isolado), pode ser realizado o modelo de cultivo “em dois passos”, associando esses dois sistemas. Nesse modelo, é efetuado inicialmente o cultivo *in situ*, no intuito de maximizar a ativação folicular e o crescimento dos folículos pré-antrais iniciais, e em seguida, realiza-se o isolamento e cultivo dos folículos secundários crescidos *in vitro* (O'BRIEN; PENDOLA; EPPIG, 2003; TELFER et al., 2008). A grande vantagem desse sistema é que este mantém a interação celular entre o estroma e os folículos nos estágios mais iniciais, sendo capaz de garantir uma boa ativação e fornecer um maior número de folículos secundários para a utilização no cultivo (JIN et al., 2010; SMITZ et al., 2010). Através do sistema de cultivo de dois passos, folículos primordiais bovinos foram cultivados inclusos em tecido ovariano (*in situ*) até o estágio secundário e, em seguida, foram isolados para posterior crescimento *in vitro*. Entretanto, estes autores não conseguiram produzir embrião, necessitando, desta forma, de mais estudos para este tipo de cultivo nessa espécie (MCLAUGHLIN; TELFER 2010). Adicionalmente, utilizando esse mesmo sistema de cultivo, outros autores conquistaram resultados satisfatórios e obtiveram a produção de embriões e o

nascimento de 59 camundongos viáveis através de folículos primordiais cultivados *in vitro* (O'BRIEN et al., 2003). A seguir, serão listados os resultados mais promissores obtidos através do cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais.

2.5. Estado atual do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais

Notável progresso tem sido observado no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais em diferentes espécies animais. O cultivo *in vitro* de folículos secundários resultou na produção de oócitos maduros, os quais foram fecundados *in vitro*, produzindo embriões nas seguintes espécies: suínos (WU; TIAN, 2007); bubalinos (GUPTA et al., 2008); ovinos (ARUNAKUMARI; SHANMUGASUNDARAM; RAO, 2010; LUZ et al., 2012); caprinos: (SARAIVA et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2011) e primatas não humanos (XU et al., 2013). No entanto, nestas espécies citadas, a quantidade de embriões produzidos a partir de oócitos provenientes de folículos pré-antrais crescidos *in vitro* ainda é limitada. Os resultados mais satisfatórios foram obtidos por Eppig & O'Brien. (2003), que obtiveram o nascimento de 59 camundongos saudáveis a partir de folículos primordiais crescidos e maturados *in vitro*. Além disso, após cultivo *in vitro* de oócitos derivados de folículos pré-antrais secundários obtidos de tecido ovariano vitrificado de camundongos, Wang et al. (2011) obtiveram a produção de embriões e o nascimento de crias viáveis. Apesar desse notório avanço no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais com as referidas espécies, busca-se otimizar as pesquisas para que sejam obtidos resultados satisfatórios em outras espécies, como a ovina. Portanto, para que bons resultados sejam alcançados, a exemplo da produção de embriões, é fundamental que seja estabelecido o meio de cultivo *in vitro* ideal.

2.6. Importância da composição do meio de cultivo *in vitro*

A composição do meio é a etapa crucial para o sucesso do cultivo *in vitro*. Nesse sentido, para o melhor desenvolvimento *in vitro* de folículos ovarianos, têm-se utilizado, rotineiramente, meios comerciais, destacando-se,

dentre eles, o Meio Essencial Mínimo alfa-modificado (α -MEM), que já foi utilizado em diferentes espécies, mantendo a viabilidade e promovendo o crescimento folicular (GAO; WANG; WU, 2007; SILVA et al., 2010). Este é um meio rico em substâncias, como eletrólitos, antioxidantes, aminoácidos, substratos energéticos, vitaminas e precursores de DNA (PICTON et al., 2008; FAUSTINO et al., 2013). Porém, apesar do meio α -MEM possuir várias substâncias em sua composição, estudos vêm mostrando a necessidade de adicionar substâncias a esse meio de cultivo de base para um melhor desenvolvimento folicular ovariano (SILVA et al., 2004; ABEDELAHI et al., 2008; RODRIGUES et al., 2010; GOUVEIA et al., 2016). Dentre essas substâncias, merecem enfoque os antioxidantes que, dentre outras substâncias, são comumente adicionados ao meio de base e, por sua vez, atuam benéficamente sobre a foliculogênese (LINS et al., 2017). No próximo tópico, serão enfatizadas algumas consequências da produção de espécies reativas de oxigênio, bem como serão mostradas substâncias com potencial antioxidante, que já foram testadas no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos.

2.7. Estresse oxidativo e antioxidantes no meio de cultivo folicular

O estresse oxidativo é uma consequência do desequilíbrio na quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO), que pode ser causado por diversos fatores relacionados com o aumento da produção de ERO e/ou a redução da disponibilidade de antioxidantes (ANDRADE et al., 2012). As ERO podem ser definidas como compostos que contenham um ou mais elétrons desemparelhados, o que as tornam instáveis e altamente reativas (AGARWAL et al., 2006). Elas são geradas pelo metabolismo energético normal e funcionam como moléculas de sinalização celular importantes. Em condições homeostáticas, as ERO intracelulares são mantidas em concentrações adequadas para cumprir essas funções e todos os excessos são tamponados por várias enzimas e moléculas antioxidantes, como as moléculas do sistema glutatona. Por outro lado, as ERO, quando acumuladas, podem reagir com moléculas biológicas (BARBOSA et al., 2014) e funcionar como sinalizadoras e

indutoras de processos que causam injúrias às células (LIMA-VERDE et al., 2007).

Nesse sentido, alguns dos muitos efeitos conhecidos da formação aumentada de ERO em sistemas biológicos incluem a peroxidação de membranas lipídicas, dano oxidativo de ácidos nucleicos e carboidratos. Para combater o estresse oxidativo, as células possuem defesas antioxidantes, classificadas em: (1) enzimas antioxidantes primárias, incluindo a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPX); (2) antioxidantes não-enzimáticos secundários de baixo peso molecular, como as vitaminas E e C. A enzima SOD converte o radical superóxido em peróxido de hidrogênio; a CAT decompõe o peróxido de hidrogênio em água (H₂O) e oxigênio (O₂); a GPX catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e o hidroperóxido orgânico em água e o álcool correspondente (TREMELLEN, 2008; AKONDI et al., 2011). As propriedades antioxidantes têm sido atribuídas à habilidade de sequestrar ERO (CELIK e ARINÇ, 2010).

Ao relacionar o estresse oxidativo x foliculogênese, é importante destacar que o metabolismo oxidativo é indispensável para a produção de energia do folículo ovariano, que, por sua vez, resulta em geração de ERO, como: hidróxido de oxigênio, íon superóxido, metais pesados e radicais livres. Embora uma quantidade crítica de ERO seja essencial para desempenhar atividades fisiológicas (MBEMYA et al., 2017), uma quantidade excessiva de ERO causa estresse oxidativo, danos às mitocôndrias e também às estruturas celulares, como os lipídios de membrana, danos aos ácidos nucleicos e proteínas (COSTA et al., 2011). Nesse sentido, uma das estratégias para neutralizar a superprodução de ERO durante o cultivo celular *in vitro* é aumentar a capacidade antioxidante dos meios utilizados.

Alguns estudos têm mostrado que a adição de antioxidantes, como o selenito de sódio, aumenta a taxa de crescimento *in vitro* e a maturação de folículos pré-antrais de camundongos (ABEDELALI et al., 2008; 2010). Além disso, o processo de maturação folicular está relacionado aos altos níveis do antioxidante transferrina adicionada ao meio de cultivo e seus receptores na célula (DEMESTERE et al., 2005). Ademais, já foi observado que o ácido ascórbico impede a peroxidação lipídica do tecido embrionário de aves

(SURRAI; FISININ; KARADAS, 2016). Durante o cultivo *in vitro*, o ácido ascórbico mantém a viabilidade e promove o desenvolvimento folicular em caprinos (ROSSETTO et al., 2009; SILVA et al., 2011), bem como auxilia na ativação folicular em bovinos (ANDRADE et al., 2012). Entretanto, além desses antioxidantes (ácido ascórbico, transferrina e selênio), outras substâncias com potencial antioxidante vêm sendo testadas no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré antrais. Um estudo recente demonstrou que a adição de ácido alfa lipóico ao meio de cultivo *in vitro* de folículos secundários melhora o desenvolvimento e o crescimento de folículos pré-antrais de bovinos (ZOHEIR et al., 2017). Outro estudo mostrou que a suplementação do meio com a coenzima Q10 (CoQ10) melhorou os níveis da capacidade total antioxidante e o desenvolvimento de folículos pré-antrais vitrificados em murinos (KASHKA; ZAVAREH; LASHKARBOLUKI, 2015).

Alguns estudos realizados por nossa equipe já demonstram o envolvimento positivo de substâncias antioxidantes com a foliculogênese. Por exemplo, a utilização de 0,05 mg/mL do extrato de *Morus nigra* na preservação de tecido ovariano ovino a 4 °C por até 6 h, resultou em percentagem de folículos morfológicamente normais superior e taxas de células apoptóticas inferiores às observadas após preservação no meio controle (MEM) (CAVALCANTE et al., 2017). Outro estudo mostrou que a rutina pode substituir a adição de transferrina, selênio e ácido ascórbico durante o cultivo *in vitro* de folículos secundários ovinos por 12 dias, mantendo a viabilidade folicular (LINS et al., 2017). Além disso, a nossa equipe também demonstrou que o extrato da *Amburana cearensis* (amburana de cheiro), puro ou adicionado de uma mistura de suplementos e FSH, pode ser utilizado como meio de cultivo de folículos secundários ovinos (BARBERINO et al., 2015) e caprinos (GOUVEIA et al., 2016), respectivamente, mantendo a sobrevivência e promovendo o desenvolvimento folicular *in vitro*. Um outro trabalho relevante mostrou que o ácido protocatecuico como o único antioxidante adicionado ao meio de cultivo *in vitro* de folículos secundários de ovino, substituindo a associação de transferrina, selênio e ácido ascórbico, mantém a sobrevivência folicular, a integridade do DNA dos oócitos cultivados, melhora os níveis intracelulares de

glutathione e de mitocôndrias ativas e promove a retomada meiótica (MENEZES et al., 2017).

Entretanto, apesar dos resultados mostrados serem promissores, a porcentagem de oócitos em metáfase II permanece baixa. Sendo assim, na tentativa de melhorar os resultados obtidos até o momento com o uso de antioxidantes no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos, no tópico abaixo, será dada ênfase aos metabólitos secundários, que substâncias amplamente estudadas devido ao seu potencial antioxidante.

2.8. Metabólitos secundários

Metabólitos secundários são compostos de natureza química produzidos pelas plantas, essenciais para a defesa da planta. No entanto, os metabólitos secundários não desempenham apenas um papel vital na defesa das plantas contra herbívoros e outras interespecies, mas vêm sendo estudados devido à sua aplicabilidade e uso em medicamentos, aromatizantes, produtos farmacêuticos, agroquímicos, biopesticidas, aditivos alimentares e fármacos. Muitos dos fármacos vendidos atualmente são simples modificações sintéticas das substâncias naturalmente obtidas das plantas (JAMWAL et al., 2017).

Nesse sentido, os metabólitos secundários são estruturalmente diversos; sua classificação é principalmente derivada de suas vias biossintéticas. Na farmacognosia, os metabólitos secundários estão classificados em três tipos (Figura 8), que são: 1) compostos fenólicos; 2) compostos alcalóides; e 3) compostos terpenóides (ZAYNAB et al., 2018).

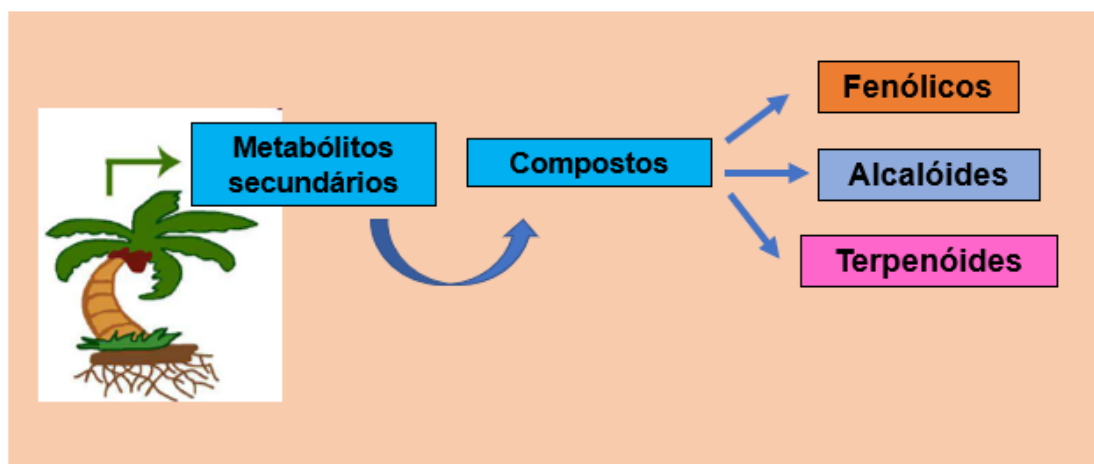


Figura 8. Classificação esquemática de metabólitos secundários (Adaptado de ZAYNAB et al., 2018).

Os compostos fenólicos estão entre as classes mais difundidas de metabólitos secundários na natureza. Esta classe de compostos é sintetizada a partir de um precursor comum: os aminoácidos fenilalanina ou tirosina. Os compostos fenólicos podem se dividir em flavonoides (antocianinas, flavonóis e isoflavonas) e não flavonoides (ácidos fenólicos) (FERRERA et al., 2016).

Os compostos alcalóides, por sua vez, são compostos nitrogenados que contêm anéis heterocíclicos e devido à presença de um ou mais átomos de nitrogênio, eles apresentam propriedades básicas. O nome alcalóide é diretamente relacionado ao fato de que quase todos os compostos alcalóides são básicos (alcalinos). Derivados de aminoácidos, em geral, eles são farmacologicamente ativos. Os alcalóides constituem um grupo de metabólitos secundários com mais de 12.000 substâncias isoladas (BOURGAUD et al., 2001).

Os compostos terpenóides compreendem monoterpenos, sesquiterpenos, sesterterpenos e triterpenos, além de esteróides, saponinas e glicosídeos cardíacos. Eles são considerados os fitoquímicos que possuem as estruturas químicas mais diversas. Monoterpenos e sesquiterpenos são comuns em óleos produzidos por plantas (SAXENA et al., 2013).

Os metabólitos secundários têm função importante tanto *in vivo* quanto *in vitro* durante a foliculogênese e a esteroidogênese ovarianas em muitas espécies animais. Alguns metabólitos secundários podem atuar como

antioxidantes, geralmente através de sua capacidade de eliminar ERO ou regular a produção hormonal ovariana. Em geral, essas propriedades são responsáveis pelas funções medicinais usadas para tratar distúrbios da infertilidade feminina. Algumas plantas contêm substâncias biológicas ativas que têm sido utilizadas para tratar a disfunção reprodutiva (MBEMYA et al., 2017). Dentre os metabólitos secundários, destacam-se os flavonoides, grupo bem distribuído em uma rica variedade de plantas, conforme será mostrado a seguir.

2.8.1. Flavonoides

Flavonoides constituem um grupo de pigmentos vegetais de ampla distribuição na natureza e sua presença pode estar relacionada com funções de defesa e de atração de polinizadores (SIMÕES et al., 2010). Estes compostos apresentam uma estrutura química difenilpropano (C₆-C₃-C₆), que consiste de dois anéis aromáticos (A e B) unidos por um anel heterocíclico oxigenado (C) (Figura 9). Substituições dos anéis A e B originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonoides (HERTOG et al., 1993; ANGELO & JORGE, 2007).

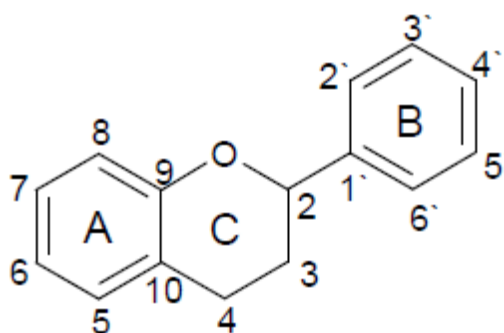


Figura 9. Estrutura química geral dos flavonoides (Retirado de SIMÕES et al., 2010)

Os flavonóides são amplamente distribuídos em plantas (LIN et al., 2018) e constituem componentes bioativos devido aos seus efeitos: anti-inflamatório, antineoplásico, antibacteriano, antimutagênico, vasodilatador e antioxidante.

Exercem atividade antioxidante principalmente através da eliminação de ERO excedentes, evitando a peroxidação lipídica (CHEN et al., 2018; EGHBALIFERIZ & IRANSHAHI, 2016).

Entre os flavonoides, destaca-se o kaempferol, especialmente devido ao seu efeito antioxidante e citoprotetor, especialmente relacionado as células reprodutivas (JAMALAN et al., 2016). Portanto, hipotetizamos que essa substância também pode exercer efeito citoprotetor em folículos ovarianos.

2.8.1.1 Kaempferol

O flavonóide kaempferol (3,5,7-trihidroxi-2- (4-hidroxifenil)-4-H-1-benzopirano-4-ona) é um composto amarelo com um baixo peso molecular [MW: 286,2 g/mol]. Como outros flavonoides, ele possui um difenilpropano em sua estrutura (C6-C3-C6) e é sintetizado pela condensação de 4-coumaroil-CoA (C6-C3) com três moléculas de malonil CoA (C6) (Figura 10; CALDEIRON MONTANO et al., 2011; KASHYAP et al., 2017).

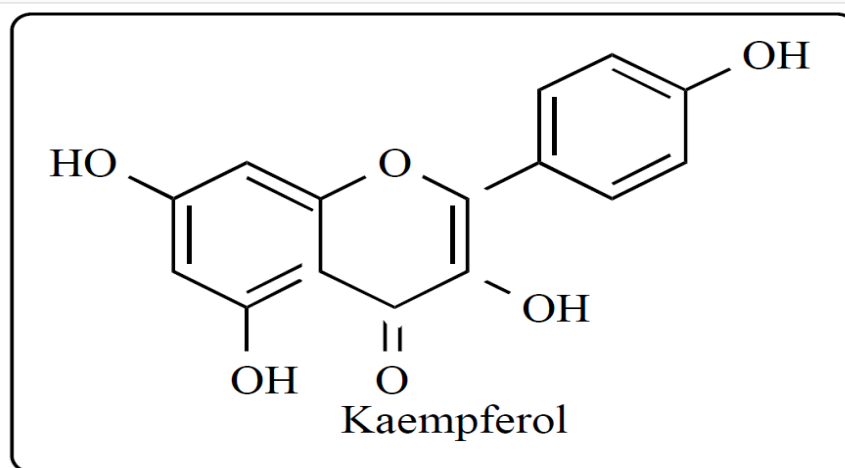


Figura 10. Estrutura química do kaempferol (Retirado de CALDEIRON MONTANO et al., 2011)

O kaempferol foi inicialmente descrito na planta *Camellia sinensis* (chá verde). Esse flavonóide é encontrado em alimentos, como maçãs, morangos e feijão (KASHYAP et al., 2017; SOMERSET & JOHANNOT, 2008), vegetais (CHE et al., 2017) e em plantas usadas na medicina tradicional, a exemplo da

Aloe vera (KEYHANIAN & STAHL-BISKUP, 2007), *Cassia angustigolia* (TERREAUX et al., 2002), entre outras (CALDEIRON MONTANO et al., 2011). Um trabalho da nossa equipe demonstrou que o kaempferol está entre os compostos extraídos da planta *Amburana cearensis* (Figura 11; GOUVEIA et al., 2016).



Figura 11. Planta (A), caule (B) e folhas (C) da *Amburana cearensis* (Adaptado de LEAL et al., 2013).

A possível associação entre o consumo de alimentos contendo kaempferol e um risco reduzido de desenvolvimento de vários distúrbios, incluindo câncer e doenças cardiovasculares está relacionada à sua capacidade antioxidante. Sendo assim, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram o efeito antioxidante do kaempferol contra vários tipos de câncer incluindo mama (LEE et al., 2017), ovário (ZHAO et al., 2017), pulmão (KUO et al., 2015), pâncreas (ZHANG et al., 2008), esôfago (YAO et al., 2016), estômago (SONG et al., 2015), cólon (CHO & PARK, 2013), próstata (HALIMAH et al., 2015), bexiga (DANG et al., 2015), rim (SONG et al., 2014) e outros. A maioria desses estudos demonstra que a capacidade do kaempferol atuar contra o estresse oxidativo está diretamente ligada à sua capacidade de eliminação de ERO, que pode ser atribuída a sua capacidade de aumentar a atividade de enzimas antioxidantes, como: superóxido dismutase (SOD), catalase e hemi-oxigenase (ZHANG et al., 2017; LIN et al., 2003; HONG et al., 2009).

O mecanismo antioxidante do kaempferol está intrinsecamente ligado aos grupos hidroxilas que são capazes de doar hidrogênio a ERO, através da

ativação da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase). Em células normais, geração de ERO e defesa antioxidante intracelular trabalham em um estado homeostático para evitar os danos causados por ERO, bem como para garantir a sua funcionalidade. ERO, incluindo ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e radical hidroxilo ($\cdot OH$). O_2^- foram gerados pela redução de O_2 mediado por NADPH oxidase que poderiam ser dismutados em H_2O_2 por SOD. H_2O_2 foi convertido em molécula de água por CAT e GPx. A glutathiona (GSH) doa elétrons para H_2O_2 e converte-se em sua forma oxidada, o dissulfeto de glutathiona (GSSG). GSSG pode ser reduzido de volta ao GSH pela glutathiona redutase (GR). Este processo é um mecanismo de defesa antioxidante essencial, conhecido como o metabolismo da glutathiona. H_2O_2 também pode ser reduzido em $\cdot OH$, o que pode causar danos ao DNA e, finalmente, levar apoptose celular. Além disso, $\cdot OH$ poderia desencadear a peroxidação lipídica. Isto pode reagir com ácido graxo poliinsaturado (LH) para gerar carbono centrado radical lipídico ($L\cdot$), que poderia interagir ainda mais com o O_2 para formar o radical peroxil lipídico ($LOO\cdot$) e malondialdeído (MDA), conforme pode ser observado na figura 12 (LIAO et al., 2016).

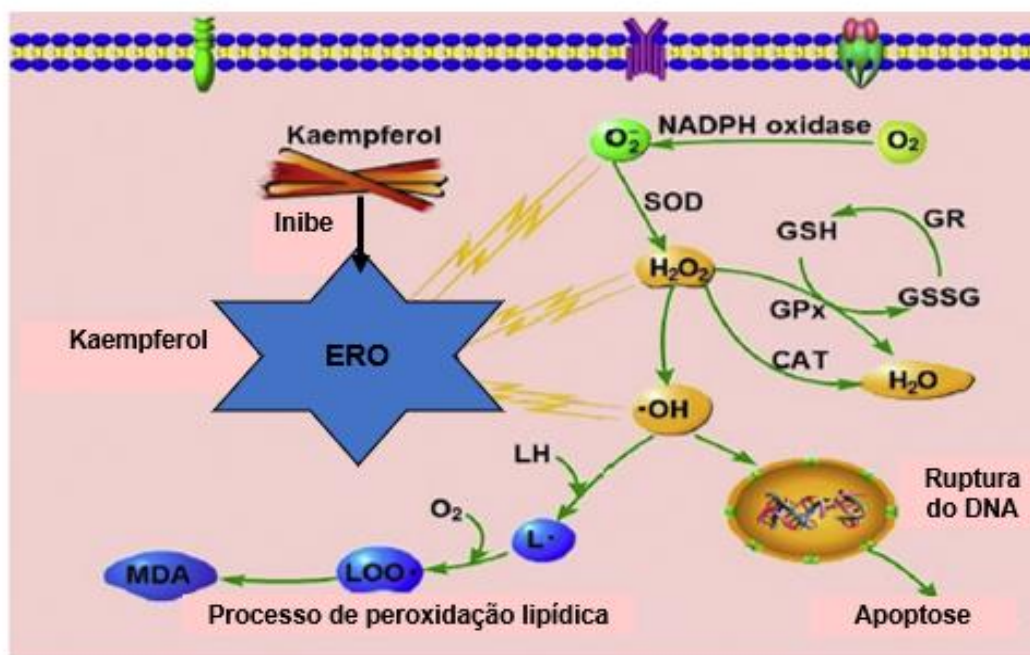


Figura 12. Mecanismo de ação do kaempferol (Adaptado de LIAO et al., 2016).

Ao se tratar do potencial citoprotetor e antiapoptótico do kaempferol, alguns estudos recentes mostraram que esse flavonoide protegeu cardiomiócitos de ratos contra a hipertrofia cardíaca *in vivo* e *in vitro* (GUO et al., 2015). Outro estudo *in vivo* mostrou que o kaempferol melhorou os danos da estrutura óssea causados pela deficiência de estrogênio, após ovariectomia, nessa mesma espécie (NOWAK et al., 2017). Além disso, o kaempferol inibiu a apoptose induzida por lipopolissacarídeo e promoveu a proliferação em células tronco mesenquimais derivadas de medula óssea de coelho (ZHU et al., 2017), protegeu contra danos decorrentes da lesão pulmonar aguda induzida pelo vírus influenza H9N2 em camundongos (ZHANG et al., 2017), neutralizou as propriedades tóxicas de 7 beta-hidroxicolesterol em células de músculo liso de ratos, diminuindo a apoptose (RUIZ et al., 2006), reduziu o dano celular induzido pela antimicina A (inibidor do transporte de elétrons nas mitocôndrias) em células semelhantes a osteoblastos (células MC3T3-E1) e induziu a ativação de algumas via de sinalização, a exemplo da via PI3K/AKT, aumentando assim a atividade metabólica inibida pela antimicina A (CHOI, 2011).

Portanto, podemos hipotetizar que o kaempferol pode promover efeitos benéficos em folículos ovarianos e, possivelmente, esses efeitos benéficos podem estar relacionados à ativação da via de sinalização PI3K/AKT (Figura 13). Como já foi visto, a ativação dessa via leva à fosforilação da AKT, sobrevivência celular (CECCONI et al., 2012) e ativação de folículos primordiais (JOHN et al., 2008).

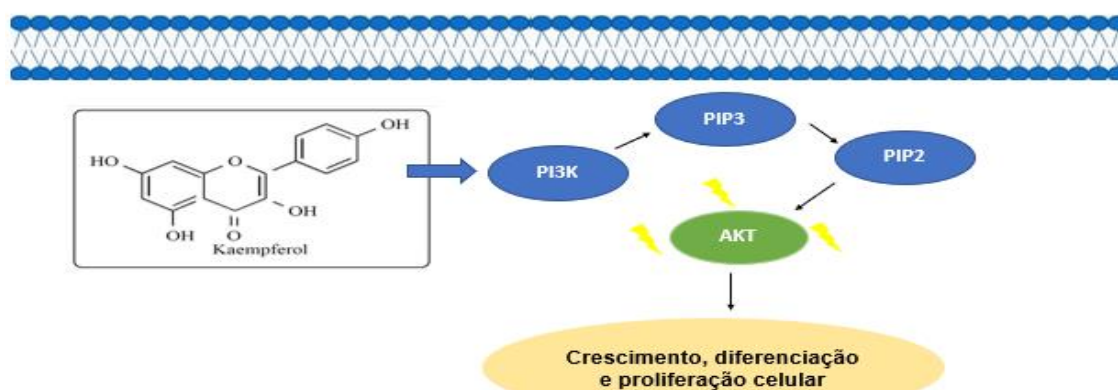


Figura 13. Kaempferol e a via de sinalização PI3K/AKT (Adaptado de LIN et al., 2018).

Estudos demonstram que o kaempferol age nas mitocôndrias (Figura 14) e sobre o Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), considerado o regulador mestre da resposta antioxidante do organismo, sendo um mecanismo de importância crítica para a manutenção da homeostase e sobrevivência celular (SAW et al., 2014; KASHYAP et al., 2017). O Nrf2 é um fator de transcrição nuclear que se encontra inativo no citoplasma ligado à proteína associada ao citoesqueleto Keap1 (Kelch-like ECH - associated protein 1) a qual impede sua translocação para o núcleo. Este fator é ativado por alterações do estado redox da célula, tais como o aumento das concentrações de ERO, perdendo, assim, a ligação com a Keap1. Nesse caso, o kaempferol dissocia o Nrf2 do Keap1 e facilita a sua translocação para o núcleo para exercer o seu papel antioxidante (KASHYAP et al., 2017). Além disso, o kaempferol age diretamente na mitocôndria, atuando na produção de SOD nessa organela e ativando o sistema mitocondrial de tioredoxina redutase (TrxR). Sabe-se que o sistema TrxR é essencial para a manutenção do equilíbrio redox do tiol celular e é crítico para a sobrevivência celular (MYERS e MYERS, 2009). Assim, a disfunção do sistema TrxR pode levar à progressão do estresse oxidativo e, por fim, à morte celular (CHOI, 2011).

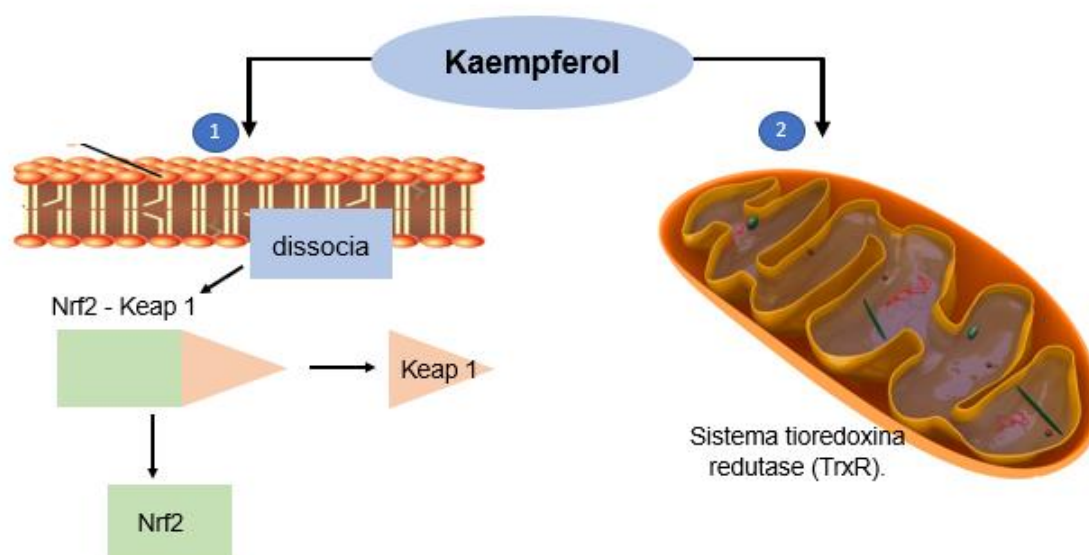


Figura 14. Esquema ilustrativo da ação direta do kaempferol nas mitocôndrias (Adaptado de KASHYAP et al., 2017).

Poucos estudos têm relatado o envolvimento do kaempferol sobre a reprodução. Nesse sentido, a adição de kaempferol ao meio de maturação *in vitro* (MIV) melhorou a competência de desenvolvimento dos oócitos suínos, aumentando a porcentagem de embriões em estágio de mórula em comparação com o meio controle (ORLOVSCHI et al., 2014). Outro estudo demonstrou que o kaempferol protegeu os espermatozóides de humanos e diminuiu os níveis de produção de malondialdeído (MDA), um marcador de peroxidação lipídica (JAMALAN et al., 2016). Além disso, já foi comprovado que o kaempferol possui efeito progestogênico em células do estroma endometrial humano (TOH et al., 2012). Um estudo recente mostrou que os flavonóides contidos na própolis, entre eles o kaempferol, mantiveram a viabilidade e motilidade de espermatozóides de coelhos após 72 h de refrigeração (EL-SEADAWY et al., 2017).

Apesar dos estudos relatados acima, poucos foram os trabalhos envolvendo o kaempferol e a foliculogênese mamífera. Além disso, os efeitos do kaempferol na sobrevivência, ativação, via de sinalização PI3K/AKT, estresse oxidativo, atividade mitocondrial e maturação *in vitro* de oócitos oriundos de folículos ovarianos cultivados *in vitro* na espécie ovina permanecem desconhecidos.

3. JUSTIFICATIVA

Sabendo-se da relevância econômica que a espécie ovina representa para várias regiões do mundo, especialmente para o Nordeste brasileiro, é de extrema importância o desenvolvimento de um sistema de cultivo *in vitro* capaz de manter a viabilidade, promover o crescimento e maturação de folículos ovarianos nessa espécie. Esta biotécnica otimizaria o potencial oocitário desses animais, aumentando a sua eficiência reprodutiva. Aliado a isto, o desenvolvimento de um sistema de cultivo *in vitro* eficiente também poderá fornecer subsídios para uma melhor compreensão dos fatores que regulam a foliculogênese inicial (ativação dos folículos primordiais e suas vias de sinalização, além do crescimento de folículos secundários) na espécie ovina, como também servirá de base para estudos em outras espécies, inclusive para a humana. Além disso, sabe-se que o resgate de milhares de oócitos imaturos (inclusos em folículos pré-antrais) a partir de um único ovário, e o posterior cultivo *in vitro* poderá contribuir para a multiplicação de animais de alto valor zootécnico (a partir da produção de embriões) ou em via de extinção.

Na busca por um sistema ideal de cultivo de folículos pré-antrais, diversas substâncias já foram testadas *in vitro*. Nesse sentido, uma atenção especial deve ser dada a adição de antioxidantes ao meio de cultivo *in vitro* para evitar que o estresse oxidativo ocorra e reduza a eficiência da biotécnica citada. Além disso, muitos antioxidantes também auxiliam na manutenção da sobrevivência e no crescimento celular, o que poderia ser benéfico ao cultivo folicular *in vitro*. Entretanto, ainda não há nenhum estudo sobre os possíveis efeitos do flavonoide kaempferol sobre o cultivo de folículos ovarianos *in situ* ou isolado. Ademais, ainda é desconhecido se o kaempferol poderia influenciar a maturação oocitária *in vitro*.

4. HIPÓTESES

- A adição de kaempferol ao meio de cultivo *in vitro* de tecido ovariano ovino mantém a sobrevivência, promove a ativação de folículos primordiais através da via de sinalização PI3K/AKT e reduz a fragmentação do DNA.
- A adição de kaempferol ao meio de cultivo *in vitro* de folículos secundários isolados ovinos mantém a morfologia, aumenta a formação de antro e melhora os níveis de glutathiona e de mitocôndrias ativas.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo Geral

- Estudar o efeito do kaempferol sobre o cultivo *in vitro* de tecido ovariano ovino e de folículos secundários isolados desta espécie.

5.2. Objetivos Específicos

- Analisar os efeitos do kaempferol na sobrevivência folicular, fragmentação do DNA, ativação do folículo primordial e crescimento de folículos ovarianos após o cultivo *in situ* (capítulo 1);
- Verificar se a inibição farmacológica da ativação da via PI3K, com a utilização do LY294002, inibe a ativação de folículos primordiais *in vitro* sob estímulos com o kaempferol (capítulo 1);
- Verificar se a fosforilação de AKT está envolvida na ação do kaempferol no ovário ovino (capítulo 1);
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de kaempferol no desenvolvimento *in vitro* de folículos secundários isolados ovinos (capítulo 2), sobre:
 - A morfologia, a formação de antro e o crescimento folicular;
 - Os níveis de glutathiona e de mitocôndrias ativas;
 - A percentagem de retomada de meiose e de maturação oocitária *in vitro*.

6. CAPÍTULO 1.

Kaempferol promotes primordial follicle activation through the PI3K/AKT signaling pathway and reduces DNA fragmentation of sheep preantral follicles cultured *in vitro*.

Jamile Maiara da Silva Santos¹, Thae Lanne Barbosa Gama Lins¹,
Ricássio de Sousa Barberino¹, Vanúzia Gonçalves Menezes¹, Bruna Bortoloni
Gouveia, Maria Helena Tavares de Matos¹

¹Núcleo de Biotecnologia Aplicada ao Desenvolvimento de Folículos Ovarianos, Universidade Federal do Vale São Francisco, 56300-990, Petrolina-PE, Brasil;

Manuscrito submetido para publicação no periódico:

Molecular, Reproduction and Development

(Qualis B1 em Biotecnologia; Fator de impacto: 3.113)

Kaempferol promotes primordial follicle activation through the PI3K/AKT signaling pathway and reduces DNA fragmentation of sheep preantral follicles cultured *in vitro*

J. M. S. Santos^a, T. L. B. G. Lins^a, R. S. Barberino^a, V. G. Menezes^a,
B. B. Gouveia^a, M. H. T. Matos^{a*}

^a Nucleus of Biotechnology Applied to Ovarian Follicle Development, Federal University of São Francisco Valley, Petrolina, PE, Brazil

Running head: Kaempferol promotes follicular activation through the PI3K/AKT pathway

*Correspondence should be addressed to:

Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF)

Campus de Ciências Agrárias. 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 (M. H. T. Matos)

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effects of kaempferol on the morphology, follicular activation, growth and DNA fragmentation of ovine preantral follicles cultured *in situ*, and the effects of a PI3K inhibitor and the expression of phosphorylated AKT (pAKT) after culture. Ovine ovarian fragments were fixed for histological and TUNEL analyses (fresh control) or cultured in α -MEM+ alone (control) or with different concentrations of kaempferol (0.1, 1, 10 or 100 μ M) for 7 days. Follicles were classified as normal or atretic, primordial or growing, and the oocyte and follicle diameters were measured. Proliferating cells were analyzed and DNA fragmentation was evaluated by TUNEL assay. Inhibition of PI3K activity was performed through pretreatment in media added with 50 μ M LY294002 for 1 h and pAKT immunohistochemistry was performed after culture in the absence or presence of LY294002. After culture, the percentage of normal follicles was similar among the treatments ($P>0.05$), except for 100 μ M kaempferol, which had less normal follicles ($P<0.05$). Moreover, kaempferol at 10 μ M showed a higher percentage of follicular activation and cell proliferation than the other treatments ($P<0.05$) and a percentage of TUNEL positive cells similar to that in the fresh control and lower than other treatments ($P<0.05$). LY294002 significantly inhibited primordial follicle activation stimulated by α -MEM+ and 10 μ M kaempferol and reduced pAKT expression in those follicles. In conclusion, 10 μ M kaempferol promotes primordial follicle activation and cell proliferation through the

PI3K/AKT pathway and reduces DNA fragmentation of ovine preantral follicles cultured *in vitro*.

Additional keywords: Flavonoid, ovary, folliculogenesis, pAKT, TUNEL.

Introduction

The majority of ovarian primordial follicles in mammals are preserved in a dormant state and only a few of them are activated to enter the growing follicle pool (Zhao et al., 2017). In this way, *in vitro* culture of ovarian cortical tissue is an important tool to understand the mechanisms and the signaling pathways involved in the initial stages of folliculogenesis, especially the activation of primordial follicles (Shea, Woodruff & Shikanov, 2014; Laronda et al., 2014; Silva, Van den Hurk, & Figueiredo, 2016; Guzel & Oktem, 2017). Short-term *in vitro* activation could also benefit infertile patients with a reduced pool of primordial follicles by providing a large number of mature gametes (Li et al., 2010; McLaughlin et al., 2018), which could be retrieved for *in vitro* fertilization and embryo transfer, followed by the delivery of healthy pups (mouse: Li et al., 2010) and a baby (Kawamura et al., 2013). Therefore, the *in vitro* activation approach could be useful for human and other mammals, including endangered species and economically important animals (Li et al., 2010). Particularly the sheep model, which has the tissue architecture similar to the human ovaries (Milenkovic, Wallin, Ghahremani, & Brännström, 2011), would help develop useful treatment strategies for improving fertility in other species.

Using *in vitro* cultures, some paracrine factors have been found to be important for the activation of ovine primordial follicles, including kit ligand (Cavalcante et al., 2015) and insulin-like growth factor-I (Bezerra et al., 2018). Although the exact factors and mechanisms involved in the initiation of primordial follicle growth are still unknown (Li et al., 2010), several studies have demonstrated that the activation of the phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) and protein kinase B (AKT) is one of the major signaling pathways involved in the control of follicular activation in mice (Reddy et al., 2009; Sobinoff et al. 2012; Zhao et al., 2014) and rat (Keating et al., 2009; Abramovich, Irusta, Parborell, & Tesone, 2010) ovaries. However, the pathways regulating primordial follicle activation in domestic species have received minimal attention (swine: Moniruzzaman, Lee, Zengyo, & Miyano, 2017; feline: Fujihara et al., 2014; Thuwanut et al., 2017; equine: Hall, Upton, McLaughlin, & Sutherland, 2017; ovine: Santos et al., 2017; Bezerra et al., 2018).

One potential signal that may regulate the activation of the PI3K pathway in oocytes is kaempferol (3,5, 7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one), a flavanol present in many plants (e.g. tea, broccoli, cabbage, beans, tomato, strawberries, grapes), botanical products commonly used in traditional medicine (*Ginkgo biloba*, *Moringa oleifera*, and propolis) (Calderón-Montaña, Burgos-Morón, Pérez-Guerrero, & López-Lázaro, 2011) or as alternative feed resources in sheep (*Moringa oleifera*: Murro, Muhikambe, & Sarwatt, 2003). Kaempferol has a wide range of pharmacological activities, including antioxidant and cytoprotective effects (Oh et al., 2016). For example, kaempferol counteracted lipopolysaccharide-induced decreased cell viability by inhibiting cell apoptosis and promoting cell proliferation in rabbit bone marrow-

derived mesenchymal stem cells (Zhu et al., 2017). Furthermore, kaempferol restored motility of aluminum-exposed sperm cells and decreased the levels of malondialdehyde (MDA) production, a lipid peroxidation marker (Jamalan, Ghaffari, Hoseinzadeh, Hashemitabar, & Zeinali, 2016).

The relationship between kaempferol and PI3K/AKT has been shown previously. Choi (2011) demonstrated that pretreatment with kaempferol prior to antimycin A (AMA) exposure reduced AMA-induced cell damage in osteoblast-like cells and also induced the activation of PI3K/AKT, thus increasing the metabolic activity inhibited by AMA. Therefore, we hypothesized that kaempferol may also act in the ovary through the PI3K/AKT pathway. However, to our knowledge, only one study has evaluated the role of kaempferol on the female reproduction. It reported that addition of kaempferol to the *in vitro* maturation medium improved the developmental competence of porcine oocytes, increasing the percentage of morula stage embryos compared to the control (Orlovschi, Miclea, Zahan, & Miclea, 2014). Nevertheless, there has been no report of the effects of kaempferol on the *in vitro* culture of ovarian tissue in any species.

Therefore, the aims of this study were to analyze whether a dose-response curve of kaempferol might have beneficial effects on the survival, primordial follicle activation and growth after ovarian tissue culture and to verify whether the PI3K/AKT signaling pathway is involved in kaempferol action in the sheep ovary.

Materials and methods

Source of ovarian tissue

Ovarian cortical tissues (n=18 ovaries) were collected at a local abattoir from 9 adult (1 - 3 years old) mixed-breed sheep for the *in vitro* culture with different concentrations of kaempferol (n=10 ovaries) or with the PI3K inhibitor (n=8 ovaries). Since slaughtered animals were used, the approval of the ethics committee was not necessary. Immediately postmortem, pairs of ovaries were washed once in 70% alcohol (Dinâmica, São Paulo, Brazil) followed by twice in Minimum Essential Medium buffered with HEPES (MEM-HEPES) and supplemented with antibiotics (100 µg/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin). The ovaries were transported within 1 h to the laboratory in tubes containing MEM-HEPES and antibiotics at 4°C (Chaves et al., 2008). Unless noted otherwise, all chemicals used in this study were purchased from Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

In vitro culture of preantral follicles with kaempferol

The *in vitro* culture was performed according to Santos et al. (2014). In the laboratory, ovarian cortex samples from each ovarian pair (n=10 ovaries) were cut into slices approximately 3 mm x 3 mm (1 mm thick) in size using a needle and scalpel under sterile conditions. For each animal, one slice of tissue was randomly selected and immediately fixed for histological and TUNEL analyses (fresh control). The remaining slices of the ovarian cortex were cultured individually in 1 mL of culture medium in 24-well culture dishes for 7 days at 39 °C in an atmosphere of 5% CO₂ in the air. The base culture medium

(control) consisted of α -MEM (pH 7.2–7.4) supplemented with 10 ng/mL insulin, 2.5 μ g/mL transferrin, 4.0 ng/mL selenium, 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine and 1.25 mg/mL bovine serum albumin (BSA), which is referred to as α -MEM⁺. The ovarian fragments were cultured in α -MEM⁺ alone or with different concentrations of kaempferol (0.1, 1, 10 or 100 μ M), which were chosen based on a previous study (Zhang, Zhen, Maechler, & Liu, 2013). Each treatment was repeated five times, thus using the ovaries of five different animals. The culture medium was replenished every two days.

Morphological evaluation of the preantral follicles cultured in vitro

Tissues from the fresh control and from all cultured treatments were fixed in 10% buffered paraformaldehyde (Dinâmica) for 18 h, dehydrated in increasing concentrations of ethanol (Dinâmica) and clarified with xylene (Dinâmica). After paraffin embedding (Dinâmica), the ovine ovarian tissues were cut into 5 μ m sections, and every section was mounted on glass slides and stained with hematoxylin and eosin (Vetec, São Paulo, Brazil).

The preantral follicles were evaluated by light microscopy (Nikon, Tokyo, Japan; 400x magnification) in the section where the oocyte nucleus was visible. The follicles were classified individually as histologically normal when an intact basement membrane was attached by one or more layers of granulosa cells that were well organized, without swelling or any pyknotic nuclei; the surrounding granulosa cells were in close contact with the oocyte, which did not show cytoplasm contraction and/or pyknotic nuclei. The atretic follicles were defined as those with a retracted oocyte, swelling or disorganized granulosa

cells detached from the basement membrane, and/or pyknotic nucleus in any of the follicle structures (oocyte or granulosa cells). Overall, 150 follicles were evaluated for each treatment (30 follicles per treatment x 5 replicates = 150 follicles), totaling 900 preantral follicles.

Assessment of the in vitro follicular activation and growth

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 the follicular activation (transition from primordial to growing follicles, when surrounding squamous pregranulosa cells become cuboidal and begin to proliferate) was performed by quantifying the follicles at different stages of follicular development (Silva et al., 2004), as primordial (one layer of flattened granulosa cells around the oocyte) or growing follicles (intermediate: one layer of flattened to cuboidal granulosa cells; primary: one layer of cuboidal granulosa cells, and secondary: two or more layers of cuboidal granulosa cells around the oocyte). The proportion of primordial and growing follicles was calculated at day 0 (fresh control) and after 7 days of culture. In addition, from the basement membrane, the major and minor axes of each oocyte and follicle were measured by using the Image-Pro Plus® software (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD, USA). The average of these two measurements was used to determine the diameters of both the oocyte and the follicle.

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemistry

Proliferating cells were detected with proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemistry before and *after culture*. Immunohistochemistry was performed as described previously (Barberino et al., 2017). Briefly, 5 µm-sections were cut on a microtome (EasyPath, São Paulo, Brazil) and mounted in Starfrost glass slides (Knittel, Braunschweig, Germany). The slides were incubated in citrate buffer (Dinâmica) at 95°C in a humidified decloaking chamber for 40 min to retrieve antigenicity, and endogenous peroxidase activity was prevented by incubation with 3% H₂O₂ (Dinâmica) and methyl ethanol (QEEL, São Paulo, Brazil) for 10 min. Non-specific binding sites were blocked using 1% normal mouse serum (Biocare, Concord, USA) diluted in phosphate-buffered saline (PBS). Subsequently, the sections were incubated in a humidified chamber for 90 min at room temperature with rabbit polyclonal anti-PCNA antibody (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Then, the sections were incubated for 30 min with MACH4 Universal HRP-polymer (Biocare). The protein localization was demonstrated with diaminobenzidine (DAB; Biocare), and the sections were counterstained with haematoxylin (Vetec) for 40 s. Negative control (reaction control) underwent all steps except the primary antibody incubation.

Only follicles that contained an oocyte nucleus were analyzed for proliferating cell assay. The number of PCNA positive granulosa cells (brown staining) was counted in ten randomly fields per treatment using Image-Pro Plus® software (Media Cybernetics Inc.). The percentage of PCNA positive cells was calculated as the number of cells in proliferation out of the total number of cells (x 100).

Detection of DNA fragmentation by TUNEL Assay

Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay was used for a more in-depth evaluation of the ovine preantral follicle quality before and after the *in vitro* culture. TUNEL was performed using a commercial kit (In Situ Cell Death Detection Kit, Roche Diagnostics Ltd., Indianapolis, USA) as previously described (Barberino et al., 2017). Briefly, the sections of 3 µm from each block were cut on a microtome (EasyPath) and mounted in Starfrost glass slides (Knittel). The slides were incubated in citrate buffer (Dinâmica), at 95°C in a deekloaking chamber (Biocare) for 40 min to retrieve antigenicity, and endogenous peroxidase activity was prevented by incubation with 3% H₂O₂ (Dinâmica) and methyl ethanol (QEEL) at room temperature for 10 min. After rinsing in phosphate-buffered saline (PBS), the sections were incubated with the TUNEL reaction mixture at 37°C for 1 h. Thereafter, the specimens were incubated with Converter-POD in a humidified chamber at 37°C for 30 min. DNA fragmentation was revealed by incubation of the tissues with DAB for 1 min. Finally, the sections were counterstained with Harry's haematoxylin (Vetec) in a dark chamber at room temperature for 1 min, dehydrated in ethanol, cleared in xylene, and mounted with balsam (Dinâmica). For negative controls (reaction controls), slides were incubated with a labeled solution (without terminal deoxynucleotidyl transferase enzyme) instead of the TUNEL reaction mixture.

The DNA fragmentation in the preantral follicles was evaluated as described previously (Barberino et al., 2017). Only follicles that contained a

visible oocyte nucleus were analyzed and the number of brown TUNEL positive cells (oocyte and granulosa cells) was counted in ten randomly fields per treatment by using Image-Pro Plus® software (Media Cybernetics Inc.). The percentage of the TUNEL positive cells was calculated as the number of cells with fragmented DNA out of the total number of cells (x 100).

Pharmacologic inhibition of the PI3K pathway

The aim was to test the hypothesis that pharmacological inhibition of the PI3K pathway would inhibit the actions of kaempferol on sheep primordial follicle activation and survival (morphology) *in vitro*. For this *in vitro* culture, additional pairs of sheep ovaries (n=8) were collected, transported to the laboratory and fragmented as described above. The ovarian fragments were cultured for 7 days in the control medium (α -MEM+) or in α -MEM+ supplemented with 10 μ M kaempferol without the PI3K inhibitor, or in these treatments in the presence of the PI3K inhibitor (α -MEM+ supplemented with PI3K inhibitor or 10 μ M Kaempferol + PI3K inhibitor). For PI3K inhibition, 50 μ M of the PI3K specific inhibitor LY294002 (Cell Signaling Technologies, Danvers, USA) was added to the control medium (α -MEM+) for 1 h (before kaempferol supplementation) at 39°C and 5% CO₂ in the air. Media were changed and treatments replenished every other day (including the inhibitor). The concentration of LY294002 (50 μ M) was chosen according to Ryan et al. (2008) and Adhikari, Risal, Liu, & Shen (2013).

After this culture, the ovarian tissue was fixed, processed for histological evaluation and preantral follicles were examined for morphological aspects

(histologically normal or atretic) and developmental stages (primordial or growing follicles) as described above.

Immunohistochemistry for the evaluation of the expression of pAKT

To check the effectiveness of LY294002 in suppressing PI3K signaling, we evaluated the expression of AKT phosphorylation (pAKT) in the ovaries. Following *in vitro* culture for 7 days, the ovarian fragments from α -MEM+ or those treated with 10 μ M kaempferol in the absence or presence of LY294002 were destined to immunohistochemistry, which was carried out as described above, but the slides were incubated with a rabbit polyclonal anti-p-AKT antibody (1:40; Santa Cruz Biotechnology) instead of the anti-PCNA antibody. Moreover, positive control was performed using canine mammary tumor (Lin, Bacchi, Baracat, & Carvalho, 2014).

The immunostaining (brown staining) was subjectively classified as absent, weak, moderate or strong in the oocyte and the granulosa cells. Only follicles that contained an oocyte nucleus were analyzed. The slides were examined by using a microscope (Nikon) under 400x magnification.

Statistical analysis

The percentages of morphologically normal, primordial and growing follicles from both cultures (without and with the PI3K inhibitor) were submitted to Shapiro Wilk test. Thereafter, ANOVA, and the Tukey's test were applied for comparison among treatments. Values of proliferating cells and TUNEL positive

cells were submitted to Chi-square test. The results of follicular survival and growth were expressed as the mean \pm SD, and the results of follicular activation were expressed as the mean \pm SEM. The differences were considered to be statistically significant when $P < 0.05$.

Results

Follicular morphology and development after in vitro culture

The preantral follicles in the fresh control (Fig. 1A) and those cultured in the medium containing 10 μ M kaempferol (Fig. 1B) showed centrally located oocytes and granulosa cells surrounded by normal intact basement membranes. Atretic follicles with a retracted oocyte and pyknotic nucleus, and disorganized granulosa cells could be observed after *in vitro* culture at the highest concentration of kaempferol (100 μ M) (Fig. 1C).

The percentage of morphologically normal follicles decreased significantly after 7 days of culture in all treatments compared to the fresh control (Fig. 1D). In addition, the percentage of normal follicles (survival) was similar among the treatments ($P > 0.05$), except for 100 μ M kaempferol, which had significantly less normal follicles ($P < 0.05$).

In all culture conditions, a significant reduction in the percentage of primordial follicles (Figs. 2A and 2D) was observed concomitant with an increase in the percentage of growing follicles (Fig. 2B, 2C and 2E) compared

to the fresh control. Furthermore, a higher follicular activation was observed in the tissue cultured for 7 days in 10 μM kaempferol than other treatments ($P < 0.05$). Nevertheless, a significant reduction in the follicle diameter was observed when the tissues were cultured in medium containing 100 μM kaempferol compared to the fresh control and the other treatments (Table 1). Moreover, the oocyte diameter also reduced significantly in the follicles cultured in 0.1 or 100 μM Kaempferol compared to the fresh control.

Granulosa cell proliferation using PCNA immunohistochemistry

Ovarian follicles cultured in the fresh control (Fig. 3A) or in α -MEM+ (Fig. 3B) did not have or had less proliferating cells than ovarian tissue that had been cultured in medium containing 10 μM Kaempferol (Fig. 3C). Negative control did not show staining for PCNA (Fig. 3D). The percentage of PCNA-positive cells in the 10 μM kaempferol (42.5%) was significantly higher than in the fresh control (15.0%) and other treatments (α -MEM+: 18.0%; 0.1 μM kaempferol: 6.8%; 1 μM kaempferol: 5.0%; 100 μM kaempferol: 7.1%) (Fig. 3E).

Analysis of DNA fragmentation

The ovarian tissue cultured in medium containing 10 μM kaempferol maintained the percentage of TUNEL positive cells similar ($P > 0.05$) to that observed in the fresh control (3.29% and 1.86% for 10 μM kaempferol and fresh control, respectively; Table 2). In addition, kaempferol at 10 μM (Fig. 4A) significantly reduced the DNA fragmentation compared to the other treatments

(21.67%, 14.14%, 11.06% and 20.09% for α -MEM+, 0.1 μ M, 1 μ M and 100 μ M kaempferol, respectively; Table 2). In all treatments, DNA fragmentation occurred in the granulosa cells and more frequently in the oocyte (Fig. 4B). Negative control did not show staining for TUNEL analysis (Fig. 4C).

Follicular morphology after inhibition of the PI3K pathway

The percentage of morphologically normal follicles decreased significantly after 7 days of culture in the ovarian tissue pretreated with or without PI3K inhibitor, compared to the fresh control (Fig. 5). Moreover, pretreatment of the ovine ovarian tissue with the PI3K inhibitor did not influence follicular survival ($P>0.05$; Fig. 5).

Effect of PI3K inhibition on pAKT protein staining

The competitive inhibitor of PI3K (LY294002) was used to confirm that AKT is a downstream phosphorylation target of PI3K in ovine follicles. After culture in the absence of the PI3K inhibitor, oocytes from primordial or intermediate follicles showed a moderate reaction for pAKT in both α -MEM+ (Fig. 6A) and 10 μ M kaempferol (Fig. 6B) treatments. Positive control (mammary tumor) showed a moderate reaction for pAKT (Fig. 6C). In the presence of LY294002, the oocytes showed a weak reaction for pAKT (Fig. 6D and 6E). Negative control did not show staining for pAKT expression in ovarian follicles (Fig. 6F) or in mammary tumor (Fig. 6G).

Follicular development after in vitro culture with PI3K inhibitor

As observed previously, in the absence of the PI3K inhibitor (LY294002), a significant reduction in the percentage of primordial follicles (Fig. 7A) was observed concomitant with an increase in the percentage of growing follicles (Fig. 7B) after the culture in α -MEM+ or 10 μ M kaempferol compared to the fresh control. Moreover, the follicular activation was significantly higher after the ovarian tissue culture in 10 μ M kaempferol than in α -MEM+ in the absence of LY294002. However, the pretreatment of ovarian tissue with LY294002 significantly inhibited the primordial follicle activation stimulated by both treatments (α -MEM+ and 10 μ M kaempferol).

Discussion

To our knowledge, these are the first data demonstrating the effects of kaempferol on the *in vitro* culture of ovarian preantral follicles in any species. This study showed that 10 μ M kaempferol increased primordial follicle activation, stimulated granulosa cell proliferation and reduced DNA fragmentation after culture of ovine ovarian tissue. In addition, we demonstrated that inactivation of the PI3K pathway inhibited follicular activation and reduced AKT phosphorylation, indicating that PI3K/AKT is a key regulator of primordial follicle growth in the ovary.

Although 10 μ M kaempferol did not influence the maintenance of morphologically normal follicles after *in vitro* culture, this concentration was effective in reducing DNA fragmentation in both oocytes and granulosa cells

(only 3.29% of TUNEL positive cells) compared to the control medium and other kaempferol concentrations. It is known that detection of early apoptotic changes may be beyond the scope of histological examination (Bedaiwy & Hussein, 2004). Therefore, our findings would suggest that culture in α -MEM+ (control) or under inadequate concentrations of kaempferol may have harmful effects on the ovarian tissue that were not clearly apparent from the histomorphological analysis. Despite its well-documented anti-apoptotic activity in other cells, such as pancreatic β -cells (Zhang & Liu, 2011; Varshney, Gupta, & Roy, 2017), bone marrow-derived mesenchymal stem cells (Zhu et al., 2017), and smooth muscle fibers (Ruiz, Padilla, Redondo, Gordillo-Moscoso, & Tejerina, 2006), the ability of kaempferol to reduce apoptosis in ovarian follicles has not been previously reported. Nevertheless, kaempferol at concentrations $>100 \mu\text{M}$ showed cytotoxic effects on embryo stem cells (Correia et al., 2016). Therefore, kaempferol might have cytoprotective or cytotoxic effects depending on the concentration and the type of cell as observed with the concentrations of 10 or $100 \mu\text{M}$ in the present study, respectively. The concentration of $100 \mu\text{M}$ kaempferol also reduced both follicular and oocyte diameters after *in vitro* culture, which is a sign of follicular atresia.

In this study, all treatments promoted primordial follicle growth compared to the fresh control. The spontaneous activation observed in the control medium may be explained by the mechanical ovarian fragmentation, which represents a key first step in the initiation of primordial follicle growth through the Hippo signaling pathway (Hsueh, Kawamura, Cheng, & Fauser, 2015). Moreover, there was clearly an additive effect of $10 \mu\text{M}$ kaempferol on follicular activation. There are no reports showing the effect of kaempferol on the *in vitro*

development of preantral follicles, however it has already been used for promoting *in vitro* maturation and fertilization of swine cumulus-oocyte complexes (Orlovschi et al., 2014). In addition, kaempferol inhibits cell proliferation in esophagus squamous cell carcinoma via targeting epidermal growth factor (EGF) receptor signaling pathway (Yao et al., 2016). Therefore, we may speculate that kaempferol acts in the initiation of primordial follicle growth through binding to tyrosine kinase EGF receptors. Nevertheless, an additive effect on granulosa cell proliferation was observed when ovarian fragments were cultured in 10 μ M kaempferol compared to the fresh control and the control medium.

Tyrosine kinase receptors respond to their ligands in oocytes by activation of the PI3K pathway to promote follicular activation (Li et al., 2010). Therefore, to verify the involvement of the PI3K/AKT signaling in the regulation of ovine primordial follicle activation stimulated by kaempferol, we exposed ovaries to the PI3K inhibitor LY294002. In this study, LY294002 did not cause loss of preantral follicles (Fig. 5). Similar results were observed after *in vitro* culture of cat ovarian tissue in medium containing this inhibitor (Fujihara, Comizzoli, Keefer, Wildt, & Songsasen, 2014). Nevertheless, follicular activation has been inhibited by LY294002 in α -MEM+ and 10 μ M kaempferol. Therefore, the PI3K pathway could be potentially involved in ovine primordial follicle activation *in vitro*, which is in agreement with the findings reported for other species (rat: Keating, Mark, Sen, Sipes, & Hoyer, 2009; mice: John, Gallardo, Shirley, & Castrillon, 2008; Sobinoff, Nixon, Roman, & McLaughlin, 2012; Zhao et al., 2014; cat: Thuwanut, Comizzoli, Wildt, Keefer, & Songsasen, 2017). A possible explanation for the involvement of the PI3K/AKT pathway in follicular

activation observed in the α -MEM+ is the presence of insulin in the control medium. Thus, blocking PI3K pathway could interfere in the metabolic effects of insulin (Khorami, Movahedi, Huzwah, & Sokhini, 2015), which promotes the initiation of primordial follicle growth (human: Louhio, Hovatta, Sjoberg, & Tuuri, 2000).

To further investigate the mechanisms behind ovine primordial follicle activation *in vitro*, the expression of pAKT was evaluated, which is an indirect measurement of PI3K activity (Granville, Memmott, Gills, & Dennis, 2006; Reddy et al., 2009) and a marker of primordial follicle activation (Reddy et al., 2009). The immunostaining of pAKT was increased in follicles from α -MEM+ and 10 μ M kaempferol; however, pAKT expression reduced in the follicles of both treatments after PI3K inhibition. It is important to note that some pAKT immunostaining was observed even after PI3K inhibition, which could be explained by the presence of intermediate follicles in fresh tissues. A previous study has shown that kaempferol is also a potent neuroprotective compound which probably protects against apoptosis through activation of AKT in retinal ganglion cells submitted to the oxidative stress induced by iodoacetic acid (Ondricek, Kashyap, Thamaake, & Vishwanatha, 2012). These data support the hypothesis that kaempferol might be an important and promising candidate in the regulation of the initiation of primordial follicle growth through the PI3K/AKT pathway. Future studies will clarify the roles of other players of the PI3K pathway such as transcription factor foxhead box O3 (John, Gallardo, Shirley, & Castrillon, 2008) during early follicle development in sheep.

In conclusion, at a concentration of 10 μ M, kaempferol promotes primordial follicle activation through the PI3K/AKT pathway, stimulates

granulosa cell proliferation and reduces DNA fragmentation of ovine preantral follicles cultured *in vitro*. Our findings highlight the importance of pharmacological inhibitors of the PI3K/AKT, which could be important tools in the follicle culture to increase our knowledge of the folliculogenesis, especially of how primordial follicles are activated, and to retrieve oocytes with an enhanced developmental potential.

Acknowledgments

J.M.S. Santos is a recipient of a grant from FACEPE (Brazil; Process IBPG-0515-5.05/14). M.H.T. Matos is supported by a grant from CNPq.

Declaration of interest

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

References

- Abramovich, D., Irusta, G., Parborell, F., Tesone, M. (2010). Intrabursal injection of vascular endothelial growth factor trap in eCG-treated prepubertal rats inhibits proliferation and increases apoptosis of follicular cells involving the PI3K/AKT signaling pathway. *Fertility and Sterility*, 93(5): 1369-77. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.01.127>
- Adhikari, D., Risal, S., Liu, K., & Shen, Y. (2013). Pharmacological inhibition of mTORC1 prevents over-activation of the primordial follicle pool in

- response to elevated PI3K signaling. *PLoS One*, 8(1):e53810.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053810>
- Barberino, R.S., Menezes, V.G., Ribeiro, A.E., Júnior, R.C.P., Jiang, X., Smitz, J.E., & Matos, M.H.T. (2017). Melatonin protects against cisplatin-induced ovarian damage in mice via the MT1 receptor and antioxidant activity. *Biology of Reproduction*, 96(6), 1244-1255.
<https://doi.org/10.1093/biolre/iox053>
- Bezerra, M. E. S., Barberino, R. S., Menezes, V.G., Gouveia, B. B., Macedo, T. J., Santos, J.M.S., Monte, A.P. O., Barros, V. R. P., Matos, M. H. T. Insulin-like growth factor-1 promotes primordial follicle growth and reduces DNA fragmentation through the PI3K/AKT signaling pathway. (2018). *Reproduction Fertility and Development*, 2018. [https://doi: 10.1071 / RD17332](https://doi.org/10.1071/RD17332)
- Bedaiwy, M.A. & Hussein, M.R. (2004). Histological evaluation and In situ localization of apoptosis in fresh and cryopreserved ovarian tissue. *Middle East Fertility Society Journal*, 9(2), 163-170.
- Calderón-Montaño, J.M., Burgos-Morón, E., Pérez-Guerrero, C. & López-Lázaro, M. (2011). A Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 11 (4), 298-344.
<https://doi.org/10.2174/138955711795305335>
- Cavalcante, A.Y., Gouveia, B.B., Barberino, R.S., Lins, T.L., Santos, L.P., Gonçalves, R.J., Celestino, J.J., Matos, M.H.T. (2015). Kit ligand promotes the transition from primordial to primary follicles after in vitro culture of ovine ovarian tissue. *Zygote*, 24 (4), 578-582. [https://doi: 10.1017 / S0967199415000556](https://doi.org/10.1017/S0967199415000556)

- Chaves, R.N., Martins, F.S., Saraiva, M.V., Celestino, J.J., Lopes, C.A., Correia, J.C., ... Figueiredo, J.R. (2008). Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, 20(5), 640–647. <https://doi.org/10.1071/RD07195>
- Choi, E.M. (2011). Kaempferol protects MC3T3-E1 cells through antioxidant effect and regulation of mitochondrial function. *Food and Chemical Toxicology*, 49(8), 1800-1805. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.04.031>
- Correia, M., Rodrigues, A.S., Perestrelo, T., Pereira, S.L., Ribeiro, M.F., Sousa, M.I. & Ramalho-Santos, J. (2016). Different concentrations of kaempferol distinctly modulate murine embryonic stem cell function. *Food and Chemical Toxicology*, 87(2016), 148-156. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.12.011>
- Fujihara, M., Comizzoli, P., Keefer, C.L., Wildt, D.E. & Songsasen, N. (2014). 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*, 90(4), 1-10. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.115089>
- Granville, C.A., Memmott, R.M., Gills, J.J. & Dennis, P.A. (2006). Handicapping the race to develop inhibitors of the phosphoinositide 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin pathway. *Clinical Cancer Research*, 12(1), 679-689. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1654>
- Guzel, Y. & Oktem, O. (2017). Understanding follicle growth in vitro: are we getting closer to obtaining mature oocytes from in vitro-grown human

- follicles of humans? *Molecular Reproduction & Development*, 84(7), 544–559. <https://doi.org/10.1002/mrd.22822>
- Hall, S.E., Upton, R.M.O., McLaughlin, E.A., Sutherland, J.M. (2017). Phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) and Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) follicular signalling is conserved in the mare ovary, 30, 624–633. <http://doi: 10.1071/RD17024>
- Hsueh, A.J.W., Kawamura, K., Cheng, Y. & Fauser, B.C.J.M. (2015). Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocrine Reviews*, 36(1), 1-24. <https://doi.org/10.1210/er.2014-1020>
- Jamalan, M., Ghaffari, M.A., Hoseinzadeh, P., Hashemitabar, M. & Zeinali, M. (2016). Human sperm quality and metal toxicants: protective effects of some flavonoids on male reproductive function. *International Journal of Fertility and Sterility*, 10(2), 215-222. <https://doi.org/10.22074/ijfs.2016.4912>
- John, G.B., Gallardo, T.D., Shirley, L.J. & Castrillon, D.H. (2008). Foxo3 is a PI3K-dependent molecular switch controlling the initiation of oocyte growth. *Developmental Biology*, 321(1), 197-204. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.06.017>
- Kawamura, K., Cheng, Y., Suzuki, N., Deguchi, M., Sato, Y., Takae, S., ... Hsueh, A.J. (2013). Hippo signaling disruption and AKT stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(43), 17474-17479. <https://doi.org/10.1073/pnas.1312830110>

- Keating, A.F., Mark, C.J., Sen, N., Sipes, I.G. & Hoyer, P. B. (2009). Effect of phosphatidylinositol-3 kinase inhibition on ovotoxicity caused by 4-vinylcyclohexene diepoxide and 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene in neonatal rat ovaries. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 241(2), 127-134. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.08.012>
- Khorami, S.A.H., Movahedi, A., Huzwah, K. & Sokhini, A.M.M. (2015). Pi3k/AKT pathway in modulating glucose homeostasis and its alteration in diabetes. *Annals of Medical and Biomedical Sciences*, 1(2), 46-55
- Laronda, M.M., Duncan, F.E., Hornick.,J.C., Xu, M., Pahnke J.E., Whelan, K.A., Shea, L.D., Woodruff TK. (2014). Alginate encapsulation supports the growth and differentiation of human primordial follicles within ovarian cortical tissue. *J Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31(8), 1013-28. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0252-x>
- Li, J., Kawamura, K., Cheng, Y., Liu, S., Klein, C., Liu, S., ... Hsueh, A.J. (2010). Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(22), 10280-10284. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001198107>
- Lin, F. M., Bacchi, C.E., Baracat, E.C., Carvalho, F. M. (2014). Loss of PTEN expression and AKT activation in HER2-positive breast carcinomas. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, 36(8), 340-347
- Louhio, H., Hovatta, O., Sjoberg, J. & Tuuri, T. (2000). The effects of insulin and insulin-like growth factors I and II on human ovarian follicles in long-term culture. *Molecular Human Reproduction*, 6(8), 694-698

- McLaughlin, M., Albertini, D.F., Wallace, W.H.B., Anderson, R.A., Telfer, E.E. (2018). Metaphase II oocytes from human unilaminar follicles grown in a multi-step culture system. *Molecular Human Reproduction*, 24(3):135-142. <https://doi.org/10.1093/molehr/gay002>
- Milenkovic, M., Wallin, A., Ghahremani, M., Brännström, M. (2011). Whole sheep ovary cryopreservation: evaluation of a slow freezing protocol with dimethylsulphoxide. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28 (1), 7-14. <https://doi.org/10.1007/s10815-010-9477-5>
- Moniruzzaman, M., Lee, J., Zengyo, H., Miyano T. (2010). Knockdown of FOXO3 induces primordial oocyte activation in pigs. *Reproduction*, 139 (2), 337-348. <https://doi:10.1530/REP-09-0207>
- Murro, J. K., Muhikambe, V. R. M. and Sarwatt, S. V. (2003). *Moringa oleifera* leaf meal can replace cottonseed cake in the concentrate mix fed with Rhodes grass (*Chloris gayana*) hay for growing sheep. *Livestock Research for Rural Development* ,15 (11), 2003. <http://www.lrrd.org/lrrd15/11/murr1511.htm>
- Oh, Y.S. (2016). Bioactive Compounds and Their Neuroprotective Effects in Diabetic Complications. *Nutrients*, 8(8): 472
- Ondricek, A.J., Kashyap, A.K., Thamake, S.I. & Vishwanatha, J.K. (2012). A comparative study of phytoestrogen action in mitigating apoptosis induced by oxidative stress. *In Vivo*, 26(5), 765-75
- Orlovski, D., Miclea, I., Zahan, M. & Miclea, V. (2014). Effect of Kaempferol on in vitro maturation of porcine oocytes. *Animal Science and Biotechnologies*, 47(2), 108-110.

- Reddy, P., Adhikari, D., Zheng, W., Liang, S., Hämäläinen, T., Tohonen, V. & Liu, K. (2009). PDK1 signaling in oocytes controls reproductive aging and lifespan by manipulating the survival of primordial follicles. *Human Molecular Genetics*, 18(15), 2813-2824. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp217>
- Ryan, K.E., Glister, C., Lonergan, P., Martin, F., Knight, P.G. & Evans, A.C. (2008). Functional significance of the signal transduction pathways AKT and Erk in ovarian follicles: in vitro and in vivo studies in cattle and sheep. *Journal of Ovarian Research*, 1(2), 1-13. <https://doi.org/10.1186/1757-2215-1-2>
- Ruiz, E., Padilla, E., Redondo, S., Gordillo-Moscoso, A. & Tejerina, T. (2006). Kaempferol inhibits apoptosis in vascular smooth muscle induced by a component of oxidized LDL. *European Journal of Pharmacology*, 529(1-3), 79–83. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.10.061>
- Santos, L.P., Santos, J.M.S., Menezes, V. G., Barberino, R. S., Gouveia, B. B., Cavalcante, Y. P., Lins, T. L. B. G., Gonçalves, R. J. S. G., Celestino, J.J. H., Matos, M. H. T. (2017). Blocking the PI3K pathway or the presence of high concentrations of EGF inhibits the spontaneous activation of ovine primordial follicles *in vitro*. *Animal Reproduction.*, 14 (Supl.1), 1298-1306. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR925>
- Santos, J.M.S., Menezes, V.G., Barberino, R.S., Macedo, T.J.S., Lins, T.L.B., Gouveia, B.B. & Matos, M.H.T. (2014). 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*, 49(3), 522-528. <https://doi.org/10.1111/rda.12322>

- Shea, L.D., Woodruff, T.K., Shikanov, A. (2014). Bioengineering the ovarian follicle microenvironment. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 16, 29–52. [https://doi: 10.1146 / annurev-bioeng-071813-105131](https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071813-105131)
- Silva, J.R.V., Van Den Hurk, R., Costa, S.H.F., Andrade, E.R., Nunes, A.P.A., Ferreira, F.V.A., ... Figueiredo, J.R. (2004). Survival and growth of goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. *Animal Reproduction Science*, 81(3-4), 273–286. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.09.006>
- Silva, J.R.V., van den Hurk, R. & Figueiredo, J.R. (2016). Ovarian follicle development *in vitro* and oocyte competence: advances and challenges for farm animals. *Domestic Animal Endocrinology*, 55(2016), 123–135. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2015.12.006>
- Sobinoff, A.P., Nixon, B., Roman, S.D. & McLaughlin, E.A. (2012). Staying alive: PI3K pathway promotes primordial follicle activation and survival in response to 3MC-induced ovotoxicity. *Toxicological Sciences*, 128(1), 258-271. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs137>
- Thuwanut, P., Comizzoli, P., Wildt, D.E., Keefer, C.L. & Songsasen, N. (2017). Stem cell factor promotes *in vitro* ovarian follicle development in the domestic cat by upregulating c-kit mRNA expression and stimulating the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway. *Reproduction, Fertility and Development*, 29(7), 1356-1368. <https://doi.org/10.1071/RD16071>
- Varshney, R., Gupta, S. & Roy, P. (2017). Cytoprotective effect of kaempferol against palmitic acid-induced pancreatic b-cell death through modulation of autophagy via AMPK/ mTOR signaling pathway. *Molecular and*

- Cellular Endocrinology*, 15(448), 1-20.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.02.033>
- Yao, S., Wang, X., Li, C., Zhao, T., Jin, H. & Fang, W. (2016). Kaempferol inhibits cell proliferation and glycolysis in esophagus squamous cell carcinoma via targeting EGFR signaling pathway, *Tumour Biology*, 37(8), 10247–10256. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-4912-6>
- Zhang, Y. & Liu, D. (2011). Flavonol kaempferol improves chronic hyperglycemia-impaired pancreatic beta-cell viability and insulin secretory function. *European Journal of Pharmacology*, 670(1), 325–332.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.08.011>
- Zhang, Y., Zhen, W., Maechler, P. & Liu, D. (2013). Small molecule kaempferol modulates PDX-1 protein expression and subsequently promotes pancreatic β -cell survival and function via CREB. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(4), 638–646.
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.03.008>
- Zhao, Q., Ma, Y., Sun, N.X., Ye, C., Zhang, Q., Sun, S. H. & Li, W. (2014). 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*, 28(8), 1424-1429. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.07.009>
- Zhao, Y., Zhang, Y., Li, J., Zheng, N., Xu, X., Yang, J., ... Zhang, M. (2017). MAPK3/1 participates in the activation of primordial follicles through mTORC1-KITL signaling. *Journal of Cellular Physiology*, 233(1), 226-237. <https://doi.org/10.1002/jcp.25868>

Zhu, J., Tang, H., Zhang, Z., Zhang, Y., Qiu, C., Zhang, L., ... Li, F. (2017).
Kaempferol slows intervertebral disc degeneration by modifying LPS-
induced
osteogenesis/adipogenesis imbalance and inflammation response in
BMSCs. *International Immunopharmacology*, 43(2017), 236–242.:
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.12.020>

Table 1. Mean oocyte and follicular diameter (mean \pm SD) in the fresh control and after *in vitro* culture of ovine ovarian tissue in different concentrations of kaempferol.

| Treatments | Follicular diameter (μm) | Oocyte diameter (μm) |
|------------------------------|---|---|
| Fresh control | 45.06 \pm 2.84 | 30.88 \pm 2.76 |
| α -MEM ⁺ | 42.23 \pm 5.03 ^{AB} | 29.92 \pm 3.81 ^{AB} |
| 0.1 μM Kaempferol | 42.30 \pm 3.81 ^B | 28.34 \pm 3.93 ^{BC*} |
| 1 μM Kaempferol | 44.84 \pm 6.71 ^{AB} | 30.15 \pm 4.54 ^{AB} |
| 10 μM Kaempferol | 47.81 \pm 9.16 ^A | 33.55 \pm 6.69 ^A |
| 100 μM Kaempferol | 36.01 \pm 9.16 ^{C*} | 24.69 \pm 2.69 ^{D*} |

* Differs significantly from fresh control ($P < 0.05$).

(^{A,B}) Different letters denote significant differences within the column ($P < 0.05$).

Table 2. Percentage of TUNEL-positive oocytes and granulosa cells before (fresh control) and after *in vitro* culture of ovine ovarian tissue in different concentrations of kaempferol.

| Treatments | Oocytes (%) | Granulosa cells (%) | Total of TUNEL- positive cells (%) |
|------------------------|------------------------|--------------------------------|---|
| Fresh control | 8.11 | 0.56 | 1.86 |
| α -MEM+ | 73.91 ^{C*} | 15.00 ^{C*} | 21.67 ^{C*} |
| 0.1 μ M Kaempferol | 68.18 ^{C*} | 7.10 ^{B*} | 14.14 ^{BC*} |
| 1 μ M Kaempferol | 64.71 ^{B*} | 0.57 ^A | 11.06 ^{B*} |
| 10 μ M Kaempferol | 21.21 ^{A*} | 0.58 ^A | 3.29 ^A |
| 100 μ M Kaempferol | 79.31 ^{C*} | 11.71 ^{B*} | 20.09 ^{C*} |

* Differs significantly from fresh control (P<0.05).

(^{A,B,C}) Different letters denote significant differences within the column (P<0.05).

Figure legends:

Figure 1: Histological sections of ovine ovarian fragments (A-C): normal follicles in the fresh control (A) and after *in vitro* culture in medium containing 10 μM kaempferol (B), and atretic follicles after *in vitro* culture in $\alpha\text{-MEM+}$ (C). O: oocyte; GC: granulosa cells; Asterisk: pyknotic nucleus; Arrow: retracted oocyte. Scale bar: 20 μm (400x). Percentages of ovine morphologically normal follicles (D) in the fresh control and after 7 days of *in vitro* culture in $\alpha\text{-MEM+}$ or in different concentrations of kaempferol. *Differs significantly from the fresh control ($P < 0.05$). (^{A,B}) Different letters denote significant differences among treatments ($P < 0.05$).

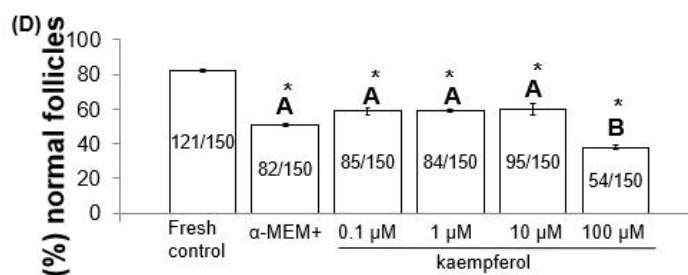
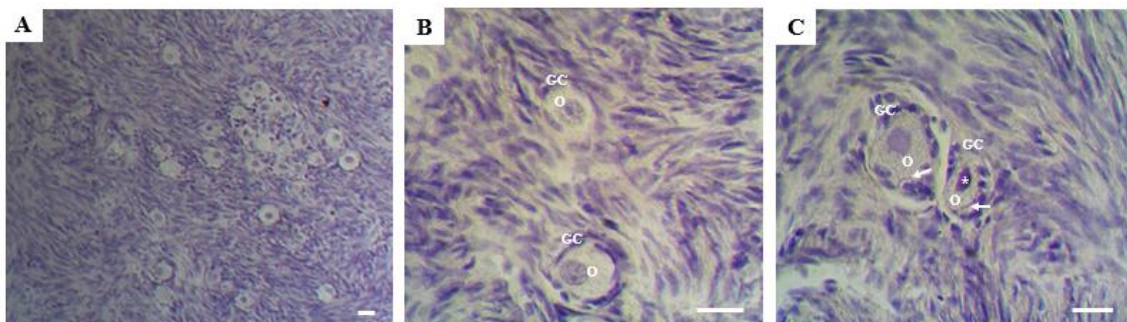


Figure 2: Histological sections of ovine ovarian fragments (A-C): normal primordial follicles (A and B - above); normal growing follicles: intermediate (B - below) and primary (C) follicles. O: oocyte; GC: granulosa cells; Arrow: cuboidal granulosa cell in the intermediate follicle. Scale bar: 20 μm (400x). Percentages of primordial (D) and growing (E) follicles in the fresh control and after 7 days of *in vitro* culture in α -MEM+ or in different concentrations of kaempferol. *Differs significantly from the fresh control ($P < 0.05$). (A,B,C) Different letters denote significant differences among treatments ($P < 0.05$).

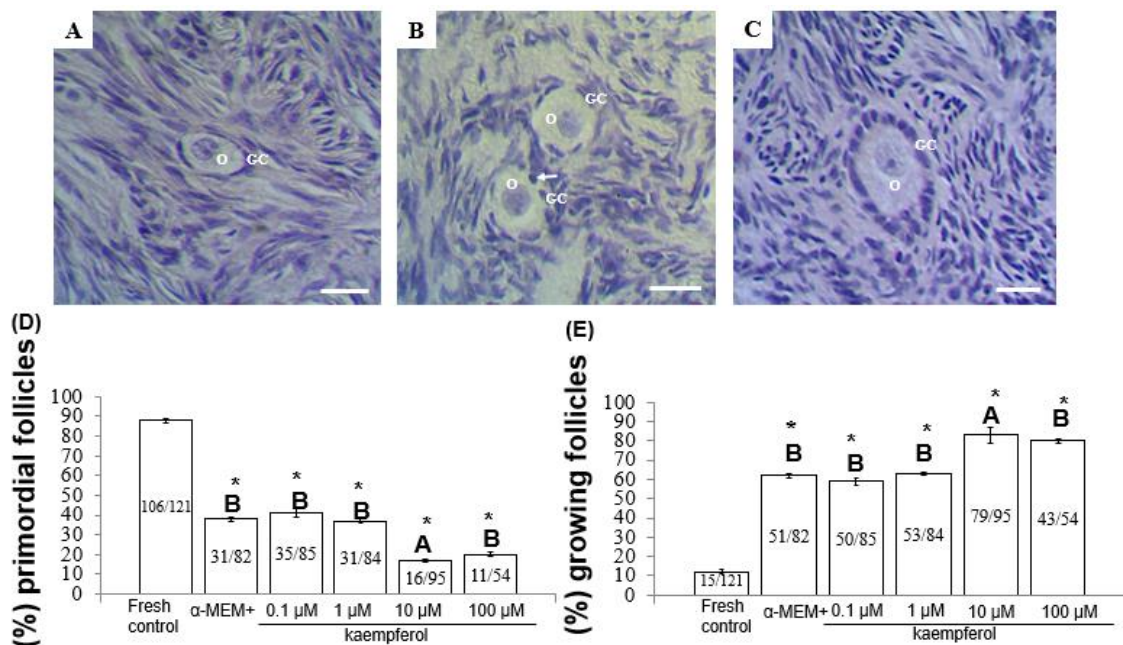


Figure 3: Immunohistochemical detection of PCNA (A-D) in the fresh control (A), α -MEM⁺ (B), in medium containing 10 μ M Kaempferol (C), and negative control (D). O: Oocyte; GC: Granulosa cells; Asterisk: PCNA-positive cell. Scale bars: 30 μ m. Percentages of PCNA-positive cells in the fresh control and after *in vitro* culture in α -MEM⁺ or in different concentrations of kaempferol. *Differs significantly from the fresh control ($P < 0.05$). (A,B) Different letters denote significant differences among treatments ($P < 0.05$).

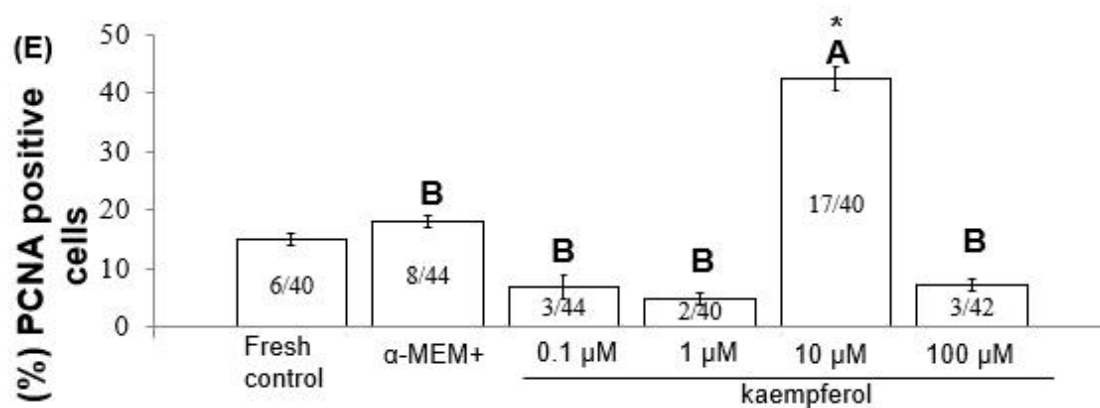
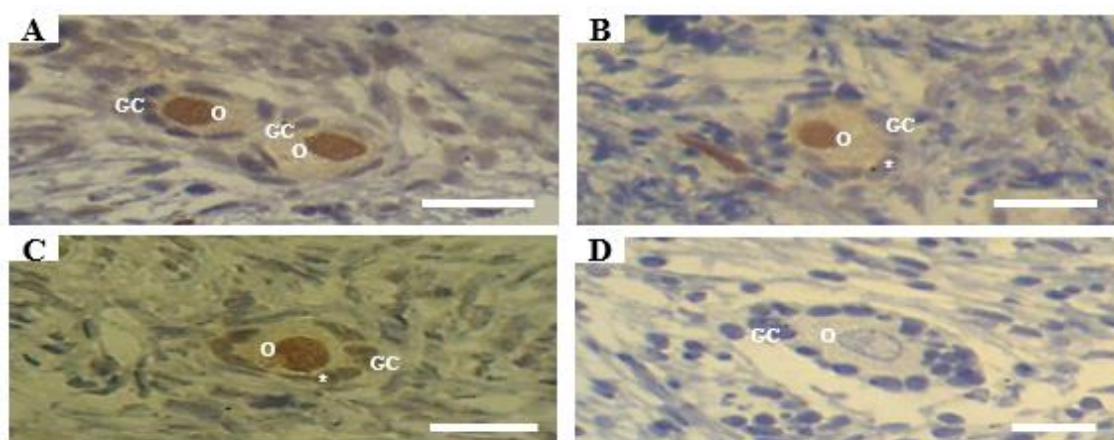


Figure 4. Detection of DNA fragmentation in sheep preantral follicles after TUNEL staining: normal follicle cultured in 10 μ M kaempferol (A), follicular cells with DNA fragmentation (in brown) after culture in α -MEM+ (B), and negative control of the reaction (C). O: oocyte; GC: granulosa cells. Scale bar: 20 μ m (400x).

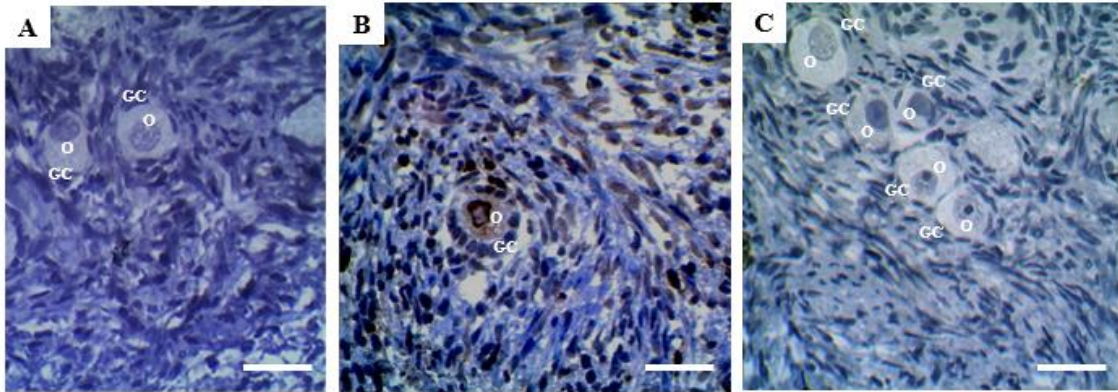


Figure 5: Percentages (mean \pm SEM) of morphologically normal follicles in the fresh control, after *in vitro* culture in α -MEM+ or in 10 μ M kaempferol in the absence or presence of LY294002 (PI3K inhibitor). *Differs significantly from the fresh control ($P < 0.05$).

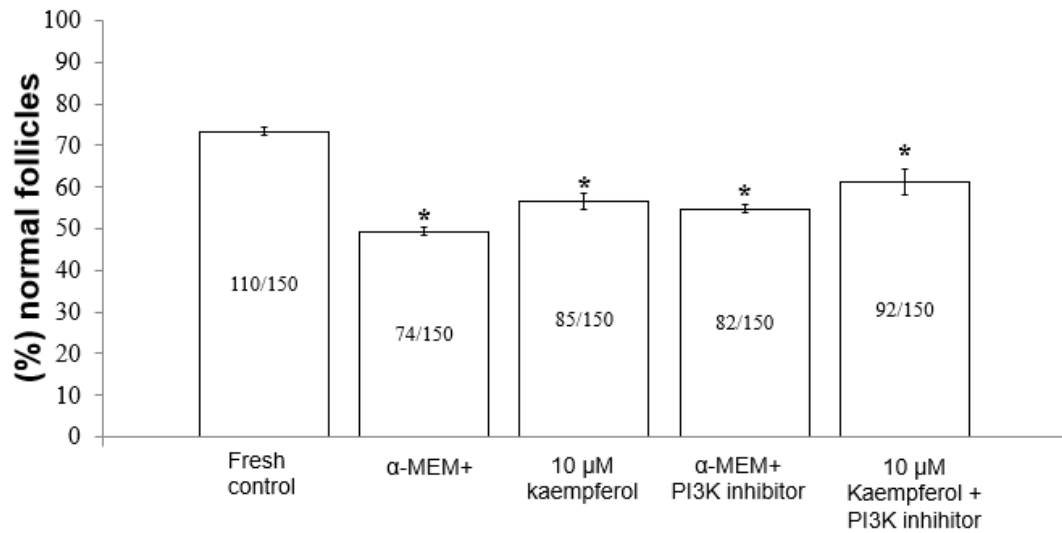


Figure 6: Immunohistochemical expression of pAKT in the sheep ovary. Follicles cultured in α -MEM+ (A) or in 10 μ M kaempferol (B) in the absence of LY294002; positive control in canine mammary tumor (C); follicles cultured in α -MEM+ (D) or in 10 μ M kaempferol (E) in the presence of LY294002; negative control in the ovary (F) and in mammary tumor (G). O: Oocyte; GC: Granulosa cells. Scale bars: 25 and 100 μ m (400x).

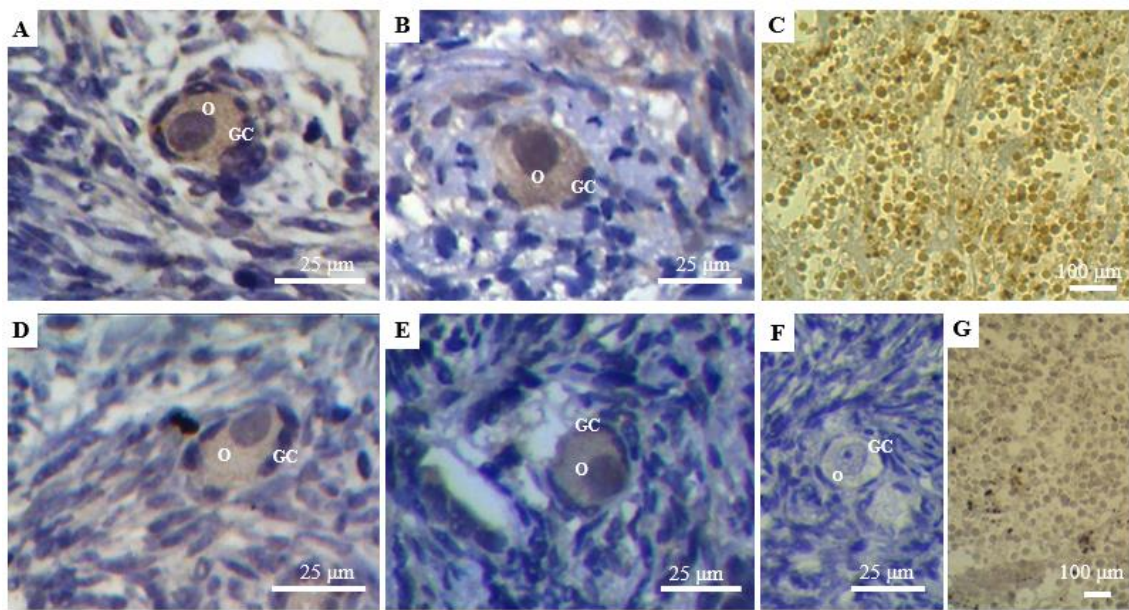
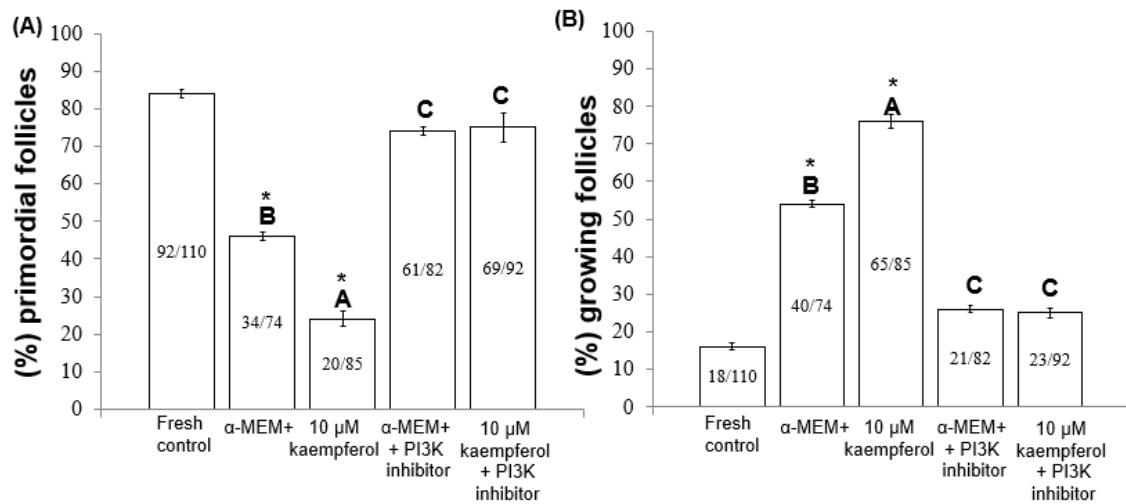


Figure 7: Percentages of normal primordial (A) and growing (B) follicles in the fresh control, after 7 days of *in vitro* culture in α -MEM+ or in 10 μ M kaempferol in the absence or presence of LY294002 (PI3K inhibitor). *Differs significantly from fresh control ($P < 0.05$). (A,B,C) Different letters denote significant differences among treatments ($P < 0.05$).



7. CAPÍTULO 2.

Kaempferol can be used as the single antioxidant in the in vitro culture medium of ovine isolated secondary follicles: effects on development, mitochondrial activity and meiotic resumption

J.M.S. Santos, A.P.O. Monte, T.L.B.G. Lins, R.S. Barberino, V.G. Menezes, B.B. Gouveia, T.J.S. Macedo, N. J. Donfack, M.H.T. Matos*

Núcleo de Biotecnologia Aplicada ao Desenvolvimento de Folículos Ovarianos, Universidade Federal do Vale São Francisco, 56300-990, Petrolina-PE, Brasil;

Manuscrito submetido para publicação no periódico:

Theriogenology

(Qualis B1 em Biotecnologia; Fator de impacto: 2.136)

Kaempferol can be used as the single antioxidant in the *in vitro* culture medium of ovine isolated secondary follicles: effects on development, mitochondrial activity and meiotic resumption

J.M.S. Santos, A.P.O. Monte, T.L.B.G. Lins, R.S. Barberino, V.G. Menezes, B.B. Gouveia, T.J.S. Macedo, N. J. Donfack, M.H.T. Matos*

Nucleus of Biotechnology Applied to Ovarian Follicle Development, Federal University of San Francisco Valley, 56300-990, Petrolina-PE, Brazil

Running head: Kaempferol on sheep preantral follicle culture

*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: helena.matos@univasf.edu.br (M. H. T. Matos)

Abstract

This study evaluated the effect of addition of kaempferol alone or combined with other antioxidants (transferrin, selenium and ascorbic acid) on *in vitro* culture of ovine isolated secondary follicles. Secondary follicles were isolated and cultured for 12 days in α -Minimal Essential Medium (α -MEM) supplemented with BSA, insulin, glutamine and hypoxanthine (α -MEM: antioxidant free-medium) or in this medium also added by transferrin, selenium and ascorbic acid (AO: base medium with antioxidants). Moreover, different concentrations of kaempferol (0.1; 1 or 10 μ M) were added to the different base media (α -MEM or AO). After culture, glutathione (GSH) levels, mitochondrial activity and meiotic resumption were evaluated. After 12 days, the percentage of normal follicles was higher ($P < 0.05$) in AO base medium than the other treatments and similar ($P > 0.05$) to α -MEM supplemented with 1 or 10 μ M kaempferol. Moreover, α -MEM plus 1 or 10 μ M kaempferol and AO medium showed similar ($P > 0.05$) follicular diameter, fully-grown oocytes, and GSH levels. However, at the end of the culture, antrum formation was higher ($P < 0.05$) in α -MEM + 1 μ M kaempferol than in AO, and similar ($P > 0.05$) to α -MEM + 10 μ M kaempferol. In addition, oocytes cultured in α -MEM supplemented with 1 μ M kaempferol showed greater ($P < 0.05$) levels of active mitochondria than α -MEM + 10 μ M kaempferol and AO medium. The rates of meiotic resumption were similar ($P > 0.05$) among α -MEM + 1 μ M kaempferol and AO medium. In conclusion, 1 μ M kaempferol can be used as the single antioxidant present in the base medium, replacing the addition of transferrin, selenium and ascorbic acid during *in vitro* culture of ovine secondary

follicles, maintaining follicular survival, increasing active mitochondria levels, and promoting the oocyte meiotic resumption.

Keywords: Flavonoid, Oocyte, Sheep, Survival

Introduction

Preantral follicles are a potential source of oocytes that can reach meiotic competence [1] and consequently through *in vitro* culture, would increase the availability of potentially fertilizable oocytes destined for assisted reproductive techniques [2]. However, this is still considered a challenge since *in vitro* conditions may increase reactive oxygen species (ROS) exposure, inactivating antioxidant enzymes, as glutathione (GSH), and/or causing mitochondrial damages, resulting in lower quality oocyte or cell death [3; 4]. Therefore, culture systems must be supplemented with antioxidants to counterbalance the effects induced by *in vitro* oxidative stress [5]. In addition to the antioxidants ascorbic acid, transferrin and selenium routinely added to the base medium [6; 7], other substances with antioxidant potential have been tested in the *in vitro* culture of preantral follicles [8; 9; 10; 11].

Recently, there has been an increasing interest in the antioxidant potential of the kaempferol [12; 13]. Kaempferol (3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-H-1-benzopyran-4-one) is a low molecular weight flavonoid (MW: 286.2 g/mol) commonly found in foods, such as broccoli, cabbage, beans, tomatoes, strawberries, grapes, and tea [14], and in plants used in traditional medicine, such as *Amburana cearensis* [15], *Aloe vera* [16] and *Cassia angustigolia* [17]. Little is known about possible effects of kaempferol on

reproduction. *In vitro* study has shown that kaempferol restored motility of aluminum-exposed human sperm cells and decreased the levels of malondialdehyde (MDA) production, a lipid peroxidation marker [18]. Furthermore, addition of kaempferol to the *in vitro* maturation (IVM) medium improved the developmental competence of porcine oocytes, increasing the percentage of morula stage embryos compared to the control [19]. Nevertheless, there has been no report of the effects of kaempferol on the *in vitro* culture of isolated secondary follicles in any species. Knowing that antioxidant agents may act as pro-oxidants when used in excess [20], we hypothesized that kaempferol could replace the other antioxidants present in the culture medium.

The aim of this study was to evaluate the effect of different concentrations of kaempferol as the only antioxidant added to the base culture medium or combined with three antioxidants typically used (transferrin, selenium and ascorbic acid) on morphology, development, intracellular GSH levels, metabolically active mitochondria and meiotic resumption of oocytes from ovine secondary follicles cultured *in vitro*.

Material and Methods

Unless indicated, media, kaempferol, supplements and chemicals used in the present study were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Source of ovarian tissue

Ovaries (n = 120) were collected at a local abattoir from 60 adult mixed-breed sheep (*Ovis aries*). Immediately post-mortem, pairs of ovaries were washed once in 70% alcohol and then 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 with antibiotics at 4°C [21].

Isolation and selection of ovine secondary follicles

Isolation, selection, culture and follicular evaluation were performed according to [9]. In the laboratory, the surrounding fatty tissues and ligaments were stripped from the ovaries; large antral follicles and corpora lutea were removed. Ovarian cortical slices (1–2 mm thick) were cut from the ovarian surface using a surgical blade under sterile conditions and subsequently placed in holding medium consisting of MEM-HEPES with antibiotics. Ovine secondary follicles, approximately 200-230 µm in diameter without antral cavities, were visualized under a stereomicroscope (SMZ 645 Nikon, Tokyo, Japan) and mechanically isolated by microdissection using 26-gauge (26 G) needles. These follicles were then transferred to 100 µL droplets containing base culture medium for the evaluation of quality. Only follicles that displayed the following characteristics were selected for culture: an intact basement membrane, two or more layers of granulosa cells and a visible and healthy oocyte that was round and centrally located within the follicle, without any dark cytoplasm. Isolated

follicles were pooled and then randomly allocated to the treatment groups, with approximately 55 follicles per group.

In vitro culture of ovine secondary follicles

After selection, the follicles were randomly divided into eight experimental groups and individually cultured (one follicle per droplet) in 100 μ L droplets of culture medium under mineral oil in petri dishes (60 x 15 mm, Corning, USA). The base control media consisted of α -MEM (pH 7.2–7.4) supplemented with 3.0 mg/mL bovine serum albumin (BSA), 10 ng/mL insulin, 2 mM glutamine and 2 mM hypoxanthine (antioxidant free-medium, referred as α -MEM) or this medium also supplemented by 5.5 μ g/mL transferrin, 5.0 ng/mL selenium and 50 μ g/mL ascorbic acid (medium containing antioxidants, referred as Antioxidant medium: AO). To verify the effects of kaempferol, both base media (α -MEM or AO) were supplemented with different concentrations of kaempferol (0.1, 1 or 10 μ M; Fig. 1). The kaempferol concentrations were chosen based on previous studies [22; 23 (unpublished data)]. All follicles were cultured at 39°C under 5% CO₂ for up to 12 days. Every 2 days, in all treatments, 60 μ L of the culture media was replaced with fresh media in each droplet.

Morphological evaluation of follicle development

The morphological aspects of all follicles were assessed every 6 days using a pre-calibrated ocular micrometer in a stereomicroscope (SMZ 645 Nikon) at 100x magnification. Only those follicles showing an intact basement

membrane, with bright and homogeneous granulosa cells and an absence of morphological signs of atresia were classified as morphologically normal follicles. Follicular atresia was recognized when a darkening of the oocytes and surrounding cumulus cells or misshapen oocytes was noted. The rupture of the basement membrane was also observed and characterized as oocyte extrusion. The following characteristics were analyzed in the morphologically normal follicles: (i) antral cavity formation, defined as the emergence of a visible translucent cavity within the granulosa cell layers, (ii) the diameter of healthy follicles, measured from the basement membrane, which included two perpendicular measures of each follicle.

After 12 days of culture, all the healthy follicles were carefully and mechanically opened with 26 G needles under a stereomicroscope for oocyte recovery. The percentage of fully grown oocytes, i.e., oocyte $\geq 110 \mu\text{m}$, was calculated as the number of acceptable quality oocytes ($\geq 110 \mu\text{m}$) recovered out of the total number of cultured follicles ($\times 100$).

Assessment of GSH intracellular levels and metabolically active mitochondria

After culture, the oocytes were recovered and intracellular glutathione (GSH) levels and mitochondrial activity were measured as previously described [8], with minor modifications. Briefly, 4-chloromethyl-6.8-difluoro-7-hydroxycoumarin (CellTracker® Blue; CMF2HC; Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) and MitoTracker Red (MitoTracker® Red, CMXRos, Molecular Probes, Melbourne, Victoria, Australia) were used to detect intracellular GSH and mitochondrial activity levels as blue and red fluorescence,

respectively, in oocytes derived from *in vitro* grown follicles in the treatments that presented the best results after 12 days (α -MEM plus 1 or 10 μ M Kaempferol and AO treatments). Approximately, 20 oocytes per treatment group were incubated in the dark for 30 minutes in PBS supplemented with 10 mM of CellTracker® Blue and 100 nM MitoTracker® Red at 39°C. After incubation, the oocytes were washed with PBS and the fluorescence was observed under an epifluorescence microscope (Nikon) with UV filters (370 nm for GSH and 579 nm for active mitochondria). Fluorescent images were saved as image TIFF format and the fluorescence intensities of oocytes were analyzed using Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Maturation of ovine oocytes from in vitro cultured secondary follicles and evaluation of chromatin configuration

In vitro maturation (IVM) was performed in the oocytes derived from *in vitro* grown secondary follicles after 12 days of culture in α -MEM + 1 μ M Kaempferol or AO treatments. The α -MEM + 1 μ M Kaempferol medium was chosen because it presented the highest levels of active mitochondria and to verify the ability of these oocytes to further resume meiosis. For IVM, additional pairs of ovine ovaries (n = 20 ovaries) were collected, washed and transported to the laboratory as described above. After culture, the cumulus oocyte complexes (COCs) enclosed in healthy follicles were carefully and mechanically collected with 26-G needles under a stereomicroscope. Only oocytes $\geq 110 \mu$ m of diameter with a homogeneous cytoplasm and surrounded by at least 1 compact layer of cumulus cells were selected for IVM. The COCs were

transferred to drops of 100 μ l of maturation medium (under oil) composed of tissue culture medium 199 (TCM 199) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 1 μ g/mL follicle stimulating hormone (human recombinant FSH; Gonalf; Serono Laboratórios, São Paulo, Brazil) and 1 μ g/mL luteinizing hormone (LH; ovine pituitary) [24] and incubated for 36 h under 5% CO₂ in the air. After IVM, the oocytes were incubated in drops of PBS containing 10 mM Hoechst 33342 for 15 min at room temperature in the dark and visualized under fluorescence microscopy (Nikon). The chromatin configuration was analyzed through observation of the intact germinal vesicle (GV), meiotic resumption (including germinal vesicle breakdown [GVBD] or metaphase I [MI]) or nuclear maturation (metaphase II [MII]).

Statistical analysis

Data from survival follicles, antrum formation, retrieval of fully grown oocytes and meiotic resumption after *in vitro* culture were expressed as percentages and compared by the Chi-squared test. Data from follicular diameter, GSH and mitochondrial activity were submitted to the Shapiro-Wilk test to verify normal distribution of residues and homogeneity of variances. Thereafter, data from follicular diameter were submitted to Kruskal-Wallis non-parametric test for comparisons. When main effects or interactions were significant, means were compared by Student Newman Keuls test. In addition, data from GSH and mitochondrial activity were submitted to ANOVA for comparisons and when main effects were significant, means were compared by

Student's t-test. The results were expressed as the means \pm standard error mean (SEM), and differences were considered significant when $P < 0.05$.

Results

Follicular morphology and development after in vitro culture

Morphologically normal follicles showed centrally located oocytes and normal granulosa cells, which were enclosed by an intact basement membrane (Fig. 2A). As early as day 6 of the culture, a small antral cavity (Fig. 2B) and atretic (Fig. 2C) follicles could be observed. The percentage of morphologically normal follicles significantly decreased from day 0 to day 12 of culture in all treatments (Fig. 3). At the end of the culture, the follicular survival was significantly higher in AO base medium (89.1%) than the other treatments, except compared to α -MEM supplemented with 1 (78.8%) or 10 (78.8%) μ M kaempferol ($P > 0.05$; Fig. 3).

All treatments induced a significant increase in the antral cavity formation rates from day 0 to day 6 of culture (Fig. 4). In addition, only α -MEM supplemented with 1 or 10 μ M kaempferol and AO treatments significantly increased the antrum formation from day 6 to day 12. At the end of the culture, antrum formation was higher ($P < 0.05$) in α -MEM + 1 μ M kaempferol (40.4%) than the other treatments, including AO medium (25.5%), except compared ($P > 0.05$) to α -MEM + 10 μ M kaempferol (36.5%) and AO + 10 μ M kaempferol (35.3%) (Fig. 4). At day 12 of culture, follicular diameter was significantly higher in both α -MEM + 1 μ M kaempferol and AO treatments than in α -MEM base

medium and AO supplemented with 1 or 10 μM kaempferol, and similar ($P > 0.05$) to the other treatments (Fig. 5). No differences ($P > 0.05$) were observed in the extrusion rate (data not shown).

At the end of culture, $\alpha\text{-MEM} + 10 \mu\text{M}$ kaempferol presented a significantly higher percentage (32.69%) of fully grown oocytes than the other treatments, except compared ($P > 0.05$) to $\alpha\text{-MEM} + 1 \mu\text{M}$ kaempferol (21.15%), AO base medium (20%), and AO + 1 μM kaempferol (18.18%) (Fig. 6).

Intracellular GSH levels and mitochondrial activity

After 12 days of culture, levels of intracellular GSH were similar ($P > 0.05$) among treatments (Fig. 7). However, oocytes cultured in $\alpha\text{-MEM}$ supplemented with 1 μM kaempferol showed greater ($P < 0.05$) levels of active mitochondria than $\alpha\text{-MEM} + 10 \mu\text{M}$ Kaempferol and AO medium (Fig. 7).

Chromatin configuration after IVM

When evaluating chromatin configuration, both treatments ($\alpha\text{-MEM} + 1 \mu\text{M}$ Kaempferol or AO) showed oocytes in GV (Fig. 8A), GVBD (Fig. 8B) and MI (Fig. 8C). However, the percentage of meiotic resumption did not differ between treatments (Table 1).

Discussion

This study was the first to evaluate the effects of kaempferol on *in vitro* culture of isolated preantral follicles. In ovine species, addition of antioxidants (transferrin, selenium and ascorbic acid) to secondary follicle culture medium, at the same concentrations used in the current study, can attenuate *in vitro* oxidative stress damages [8; 9]. Transferrin has the action of chelating hydroxyl radicals by preventing them from participation in ROS reactions [25], and selenium inhibits oxidative damage being within the structure of antioxidant enzymes like GSH-Px [26]. Ascorbic acid is a substance that has already been described for increasing the activity of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) [27]. However, in the current study, after 12 days of culture, addition of 1 or 10 μM kaempferol as the sole antioxidant to the culture medium promoted the same effects (survival, follicular diameter, oocyte development, and intracellular GSH levels) as the medium supplemented with those three different antioxidants (transferrin, selenium and ascorbic acid).

Previous research has shown that kaempferol can induce its antioxidant effects preventing lipid peroxidation [28] by increasing the expression or activity of antioxidant enzymes such as catalase (CAT), heme-oxygenase (HO), and GSH [29; 30; 31]. *In vitro* studies demonstrated that kaempferol improved viability in murine MC3T3-E1 (osteoblast-like cells) in response to oxidative stress, which includes unstable radicals prone to harm DNA [32], decreased apoptosis in human umbilical venous endothelial cells after gamma radiation [33], improved the developmental competence of porcine oocytes after IVM [19], as well as promoted cell proliferation in different cell types, such as bone marrow-derived mesenchymal stem cells in rabbit [34], pancreatic β -cells

(human and rat: [35; 36]), and smooth muscle fibers in rat [37]. Therefore, single kaempferol can be as efficient as three associated antioxidants.

Nevertheless, after 12 days of culture, α -MEM supplemented with 1 μ M kaempferol presented a higher antrum formation rate than AO base medium (Fig. 4). A study demonstrated that the kaempferol may have phytoestrogenic activity due to its chemical similarity with endogenous steroid hormones, such as estradiol [38], and therefore it may have high binding affinity for estrogen receptor (ERs) [39]. Therefore, as estradiol increased the *in vitro* antrum formation in porcine preantral follicles [40], we can suggest that the antioxidant kaempferol promoted the development (antrum formation) of ovine secondary follicles cultured *in vitro* through its phytoestrogenic activity. This finding is of great importance, since the formation of the antrum is essential for follicular development [41] and consequently to the achievement of oocytes ($\geq 110 \mu\text{m}$) capable of meiosis resumption [2].

Additionally, in an adequate concentration, kaempferol (1 μ M) increased the levels of active mitochondria compared to α -MEM + 10 μ M kaempferol and AO media (Fig. 7). A study performed by [32] showed that kaempferol acts directly on mitochondria, stimulating the production of SOD in this organelle, and activating the mitochondrial thioredoxin reductase (TrxR) system. This TrxR system is essential for the maintenance of redox balance of cellular thiol and is critical for cell survival [42]. Thus, the dysfunction of the TrxR system can lead to the progression of oxidative stress and finally cell death [32]. Therefore, we can suggest that 1 μ M kaempferol alone was able to improve mitochondrial function and consequently to support follicular survival and development. Moreover, our study showed that the tested culture conditions (culture in α -MEM

+ 1 μ M kaempferol or AO medium for 12 days) did not affect oocyte meiotic resumption (Table 1). Other studies have shown that sheep oocytes from secondary follicles cultured *in vitro* for 18 days are able to resume meiosis after 36-40 h of IVM [43; 44]. Thus, in our study, we suggest that an increase in the *in vitro* culture period (18 days) may provide oocytes capable of achieving MII.

Finally, in the present study, we observed that the use antioxidant free-medium (α -MEM) or supplemented with insufficient concentration of kaempferol (0.1 μ M), as well as the excess of antioxidants (medium containing three antioxidants plus kaempferol at 0.1, 1 or 10 μ M) negatively affected the follicular survival and/or development. It is possible that *in vitro* oxidative stress has occurred due to the absence or inefficiency of the antioxidant system, as well by prooxidant actions when antioxidants were used in excess [45].

In conclusion, kaempferol, at a concentration of 1 μ M, can be used as the single antioxidant present in base medium, replacing the addition of transferrin, selenium and ascorbic acid during *in vitro* culture of ovine secondary follicles for 12 days, maintaining follicular survival, improving antrum formation and mitochondrial activity, and promoting the oocyte meiotic resumption. It is important to note that the use of a single antioxidant in the culture medium over three antioxidants offers advantages in terms of practicality and makes the technique less costly (kaempferol is about three hundred dollars less expensive).

Acknowledgments

J. M. S. Santos receives a scholarship from the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE, Brazil). M. H. T. Matos is supported by a grant from National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

Conflict of interest

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

References

- [1] Silva JRV, Van Den Hurk R, Figueiredo JR. Ovarian follicle development *in vitro* and oocyte competence: advances and challenges for farm animals. *Domest Anim Endocrinol* 2016; 55: 123-135.
- [2] Cadenas J, Maside C, Ferreira ACA, Vieira LA, Leiva-Revilla J, Paes VM, Alves BG, Brandão FZ, Rodrigues APR, Wheeler MB, Figueiredo JR. Relationship between follicular dynamics and oocyte maturation during *in vitro* culture as a non-invasive sign of caprine oocyte meiotic competence. *Theriogenology* 2018; 107: 95-103.
- [3] Chappel S. The role of mitochondria from mature oocyte to viable blastocyst. *Obstet Gynecol Int* 2013; <http://dx.doi.org/10.1155/2013/183024>.
- [4] Succu S, Pasciu V, Manca ME, Chelucci S, Torres-Rovira L, Leoni GG, Zinellu A, Carru C, Naitana S, Berlinguer F. Dose-dependent effect of melatonin on post warming development of vitrified ovine embryos. *Theriogenology* 2014; 81: 1058–1066.
- [5] Khan I, Chowdhury MMR, Canção SH, Mesalam A, Zhang S, Khan Khalil AA, Jung EH, JB Kim, Jafri L, Mirza B, Kong IK. Lupeol supplementation improves the developmental competence of bovine embryos *in vitro*. *Theriogenology* 2018; 107: 203-210.
- [6] Cunha EV, Melo LRF, Sousa GB, Araújo VR, Vasconcelos GL, Silva AWB, Silva JRV. Effect of bone morphogenetic proteins 2 and 4 on survival and

development of bovine secondary follicles cultured *in vitro*. *Theriogenology* 2018; 110: 44-51.

[7] He X, Toth TL. *In vitro* Culture of Ovarian Follicles from *Peromyscus*. *Semin Cell Dev Biol* 2017; 61: 140-149.

[8] Lins TLBG, Cavalcante AYP, Santos JMS, Menezes VG, Barros VRP, Barberino RS, Bezerra MÉS, Macedo TJS, Matos MHT. Rutin can replace the use of three other antioxidants in the culture medium, maintaining the viability of sheep isolated secondary follicles. *Theriogenology* 2017; 89: 263-270.

[9] Menezes VG, Santos J, Macedo T, Lins T, Barberino RS, Gouveia BB, Bezerra M, Cavalcante A, Queiroz M, Palheta RC Jr, Matos M. Use of protocatechuic acid as the sole antioxidant in the base medium for *in vitro* culture of ovine isolated secondary follicles. *Reproduction in Domestic Animals* 2017; 52 (5): 890-898.

[10] Zoheir KM, Harisa GI, Allam AA, Yang L, Li X, Liang A, Abd-Rabou AA, Harrath AH. Effect of alpha lipoic acid on *in vitro* development of bovine secondary preantral follicles. *Theriogenology* 2017; 88: 124-130.

[11] Nascimento TS, Silva ISM, Alves MCMA, Gouveia BB, Barbosa LMR, Macedo TJS, Santos JMS, Monte APO, Matos MHT, Padilha FF, Lima-Verde IB. Effect of red propolis extract isolated or encapsulated in nanoparticles on the *in vitro* culture of sheep preantral follicle: impacts on antrum formation, mitochondrial activity and glutathione levels. *Reprod Domest Anim* 2018; doi: 10.1111/rda.13347.

[12] Han X, Liu CF, Gao N, Zhao J, Xu J. Kaempferol suppresses proliferation but increases apoptosis and autophagy by up-regulating microRNA-340 in human lung cancer cells. *Biomed Pharmacother* 2018; 108: 809-816.

[13] Kouhestani S, Jafari A, Babaei P. Kaempferol attenuates cognitive deficit viaregulating oxidative stress and neuroinflammation in an ovariectomized rat model of sporadic dementia. *Neural Regeneration Research* 2018; 13 (10): 1827-1832.

[14] Calderón-Montaña JM, Burgos-Morón E, Pérez-Guerrero C, López-Lázaro M. A Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 2011; 11 (4): 298-344.

- [15] Gouveia BB, Macedo TJ, Santos JM, Barberino RS, Menezes VG, Müller MC, Almeida JR, Figueiredo JR, Matos MH. Supplemented base medium containing *Amburana cearensis* associated with FSH improves *in vitro* development of isolated goat preantral follicles. *Theriogenology* 2016; 86: 1275-1284.
- [16] Keyhanian S, Stahl-Biskup E. Phenolic constituents in dried flowers of aloe vera (*Aloe barbadensis*) and their *in vitro* antioxidative capacity. *Planta Med* 2007; 73: 599-602.
- [17] Terreaux C, Wang Q, Ioset JR, Ndjoko K, Grimminger W, Hostettmann K. Complete LC/MS analysis of a *Tinneveli senna* pod extract and subsequent isolation and identification of two new benzophenone glucosides. *Planta Med* 2002; 68: 349-54.
- [18] Jamalan M, Ghaffari MA, Hoseinzadeh P, Hashemitabar M, Zeinali M. Human sperm quality and metal toxicants: protective effects of some flavonoids on male reproductive function. *International Journal of Fertility and Sterility* 2016; 10 (2): 215-222.
- [19] Orlovschi D, Miclea I, Zahan M, Miclea V. Effect of Kaempferol on *in vitro* maturation of porcine oocytes. *Animal Science and Biotechnologies* 2014; 47(2): 108-110.
- [20] Delmas D, Aires V, Dutartre P, Mazue F, Ghiringhelli F, Latruffe N. Transport, stability, and biological activity of resveratrol. *Ann N. Y Acad Sci* 2011; 1215: 48-59.
- [21] Chaves RN, Martins FS, Saraiva MVA, Celestino JJH, Lopes CAP, Correia JC, Matos MHT, Báo SN, Name KPO, Campello CC, Silva JRV, Figueiredo JR. Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured *in vitro*. *Reprod Fertil Dev* 2008; 20: 640-647.
- [22] Zhang Y, Zhen W, Maechler P, Liu D. Small molecule kaempferol modulates PDX-1 protein expression and subsequently promotes pancreatic β -cell survival and function via CREB. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2013; 24 (4): 638–646.
- [23] Santos JMS, Lins T LBG, Barberino RS, Menezes, VG, Gouveia, BB, Matos, M. HT. Kaempferol promotes primordial follicle activation through the

PI3K/AKT signaling pathway and reduces DNA fragmentation of sheep preantral follicles cultured *in vitro* (un published data).

[24] Cecconi S, Barboni B, Coccia M, Mattioli M. *In vitro* development of sheep preantral follicles. *Biol Reprod* 1999; 60: 594-601.

[25] Córdova B, Morató R, Izquierdo D, Paramio T, Mogas T. Effect of the addition of insulin–transferrin–selenium and/or L-ascorbic acid to the *in vitro* maturation of prepubertal bovine oocytes on cytoplasmic maturation and embryo development. *Theriogenology* 2010; 74: 1341–8.

[26] Pastacı Özsoğacı N, Düzgün Ergün D, Durmuş S, Tunçdemir M, Uzun H, Gelişgen R, Özçelik D. Selenium supplementation ameliorates electromagnetic field-induced oxidative stress in the HEK293 cells. *J Trace Elem Med Biol* 2018; 50: 572-579.

[27] Delrobaei F, Fatemi I, Shamsizadeh A, Allahtavakoli M. Ascorbic acid attenuates cognitive impairment and brain oxidative stress in ovariectomized mice. *Pharmacological Reports* 2018; <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2018.10.001>.

[28] Lee YJ, Suh KS, Choi MC, Chon S, Oh S, Woo JT, Kim SW, Kim JW, Kim YS. Kaempferol protects HIT-T15 pancreatic beta cells from 2-deoxy-d-ribose-induced oxidative damage, *Phytother Res* 2010; 24: 419–423.

[29] Doronicheva N, Yasui H, Sakurai H. Chemical structure-dependent differential effects of flavonoids on the catalase activity as evaluated by a chemiluminescent method. *Biol Pharm Bull* 2007; 30(2): 213-7.

[30] Hong JT, Yen JH, Wang L, Lo YH, Chen ZT, Wu MJ. Regulation of heme oxygenase-1 expression and MAPK pathways in response to kaempferol and rhamnocitrin in PC12 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2009; 237: 59-68.

[31] Zhou M, Ren H, Han J, Wang W, Zheng Q, Wang D. Protective Effects of Kaempferol against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Isolated Rat Heart via Antioxidant Activity and Inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3 β . *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2015; doi: 10.1155 / 2015/481405.

[32] Choi EM. Kaempferol protects MC3T3-E1 cells through antioxidant effect and regulation of mitochondrial function. *Food and Chemical Toxicology* 2011; 49 (8): 1800-1805.

- [33] Wang J, Li T, Feng J, Li L, Wang R, Cheng H, Yuan Y. Kaempferol protects against gamma radiation-induced mortality and damage via inhibiting oxidative stress and modulating apoptotic molecules *in vivo* and *in vitro*. *Environ Toxicol Pharmacol* 2018; 60: 128-137.
- [34] Zhu J, Tang H, Zhang Z, Zhang Y, Qiu C, Zhang L, Huang P, Li F. Kaempferol slows intervertebral disc degeneration by modifying LPS-induced osteogenesis/adipogenesis imbalance and inflammation response in BMSCs. *International Immunopharmacology* 2017; 43: 236–242.
- [35] Zhang Y, Liu D. Flavonol kaempferol improves chronic hyperglycemia-impaired pancreatic beta-cell viability and insulin secretory function. *European Journal of Pharmacology* 2011; 670 (1): 325–332.
- [36] Varshney R, Gupta S, Roy P. Cytoprotective effect of kaempferol against palmitic acid-induced pancreatic b-cell death through modulation of autophagy via AMPK/ mTOR signaling pathway. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2017; 15 (448): 1-20.
- [37] Ruiz E, Padilla E, Redondo S, Gordillo-Moscoso A, Tejerina T. Kaempferol inhibits apoptosis in vascular smooth muscle induced by a component of oxidized LDL. *European Journal of Pharmacology* 2006; 529 (1-3): 79–83.
- [38] Dixon RA. Phytoestrogens. *Annu Rev Plant Biol* 2004; 55: 225-261.
- [39] Kim SH, Choi KC. Anti-cancer Effect and Underlying Mechanism(s) of Kaempferol, a Phytoestrogen, on the Regulation of Apoptosis in Diverse Cancer Cell Models. *Toxicol Res* 2013; 29 (4): 229-234.
- [40] Tasaki H, Iwata H, Sato D, Monji Y, Kuwayama T. Estradiol has a major role in antrum formation of porcine preantral follicles cultured *in vitro*. *Theriogenology* 2013; 79: 809–814.
- [41] Rodgers RJ, Rodgers FI. Formation of the Ovarian Follicular Antrum and Follicular Fluid. *Biology of Reproduction* 2010; 82: 1021–1029.
- [42] Myers CR, Myers JM. The effects of acrolein on peroxiredoxins, thioredoxins, and thioredoxin reductase in human bronchial epithelial cells. *Toxicology* 2009; 257: 95–104.
- [43] Luz VB, Santos RR, Araújo VR, Celestino JJH, Magalhães-Padilha DM, Chaves RN, Brito IR, Silva TF, Almeida AP, Campello CC, Figueiredo JR. The

effect of LIF in the absence or presence of FSH on the *in vitro* development of isolated caprine preantral follicles. *Reprod Domest Anim* 2012; 47: 379–84

[44] Lunardi FO, Chaves RN, Lima LF, Araújo VR, Brito IR, Souza CEA, Donato MAM, Peixoto CA, Dinnyes A, Campello CC, Figueiredo JR and Rodrigues APR. Vitrified sheep isolated secondary follicles are able to grow and form antrum after a short period of *in vitro* culture. *Cell Tissue Res* 2015; 362: 241–51.

[45] Bestwick CS, Milne L, Duthie SJ. Kaempferol induced inhibition of HL-60 cell growth results from a heterogeneous response, dominated by cell cycle alterations. *Chemico-Biological Interactions* 2010; 170: 76–85.

Table 1. Meiotic stages (%) after IVM of sheep oocytes from *in vitro* grown secondary follicles after 12 days of culture in α -MEM + 1 μ M Kaempferol or in AO medium.

| Treatments | % GV (n) | % GVBD (n) | % MI (n) | % MII (n) |
|---------------------------------------|---------------|---------------|--------------|--------------|
| α -MEM+ | 46.15 (12/26) | 42.31 (11/26) | 11.54 (3/26) | 0 (0/26) |
| 1 μM Kaempferol | | | | |
| AO | 59.09 (13/22) | 36.37 (8/22) | 4.54 (1/22) | 0 (0/22) |

α -MEM: antioxidant free-medium; AO: medium containing antioxidants

Figure captions

Figure 1 - General experimental protocol for *in vitro* culture of sheep secondary follicles in different media (α -MEM or AO) without or with different concentrations of kaempferol (0.1, 1 or 10 μ M).

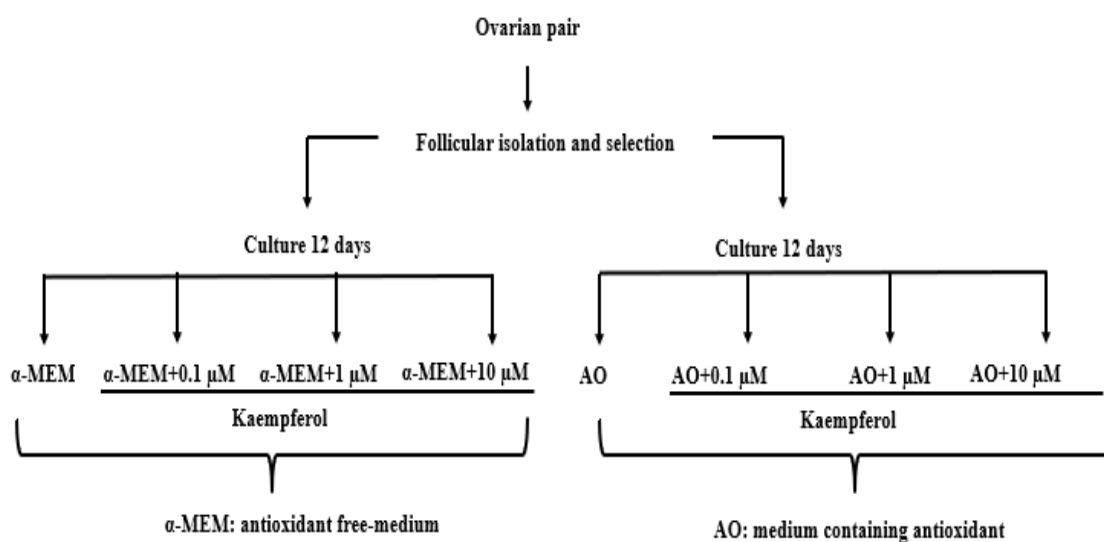


Figure 2 - Morphologically normal secondary follicle at day 0 (A); antral follicle after 6 days of culture in α -MEM + 1 μ M kaempferol (B) and atretic follicle after 6 days of culture in AO + 1 μ M kaempferol (C). GC: granulosa cells; O: oocyte. Arrow: antral cavity. Scale bar: 100 μ m.

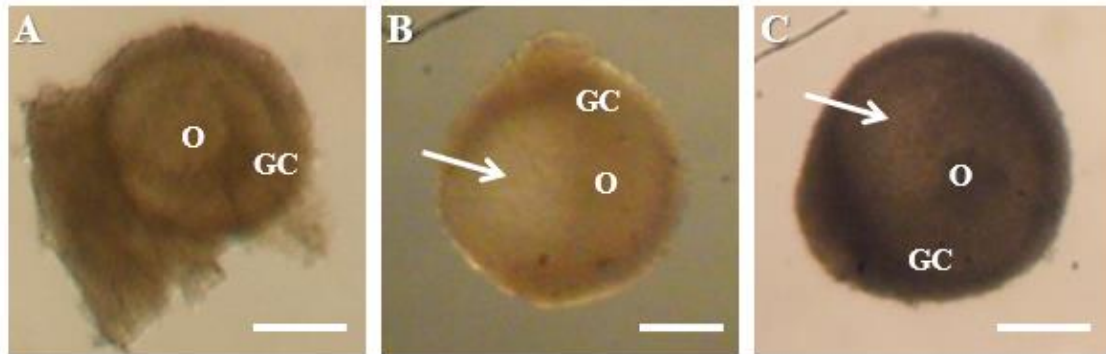


Figure 3 - Percentages of morphologically normal follicles cultured in different media (α -MEM or AO) without or with different concentrations of kaempferol (0.1, 1 or 10 μ M).

(A, B, C) Different letters denote significant differences among treatments in the same period ($P < 0.05$); (a, b, c) Different letters denote significant differences among culture periods in the same treatment ($P < 0.05$).

α -MEM: antioxidant free-medium; AO: medium containing antioxidants

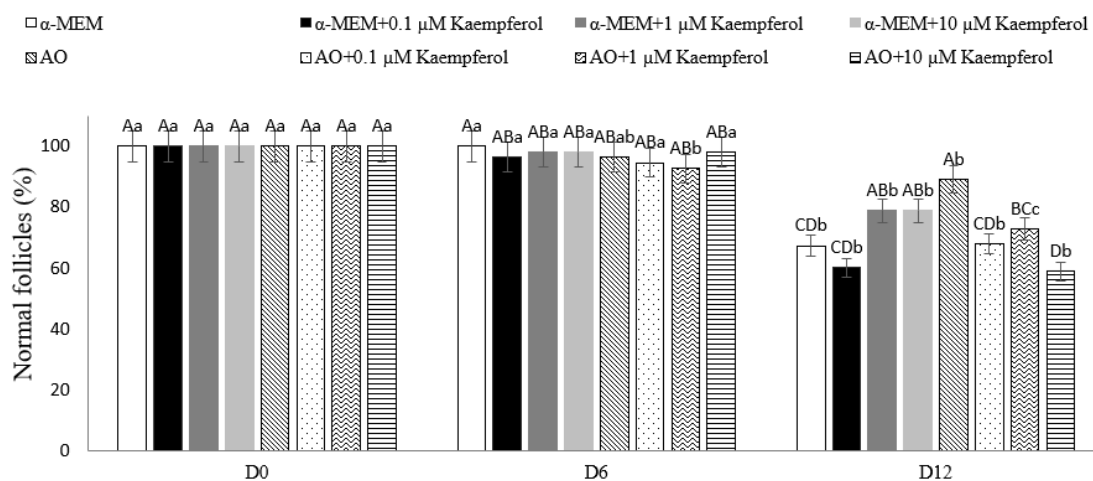


Figure 4 - Percentages of antrum formation in follicles cultured in different media (α -MEM or AO) without or with different concentrations of kaempferol (0.1, 1 or 10 μ M).

(A, B, C) Different letters denote significant differences among treatments in the same period ($P < 0.05$); (a, b, c) Different letters denote significant differences among culture periods in the same treatment ($P < 0.05$).

α -MEM: antioxidant free-medium; AO: medium containing antioxidants

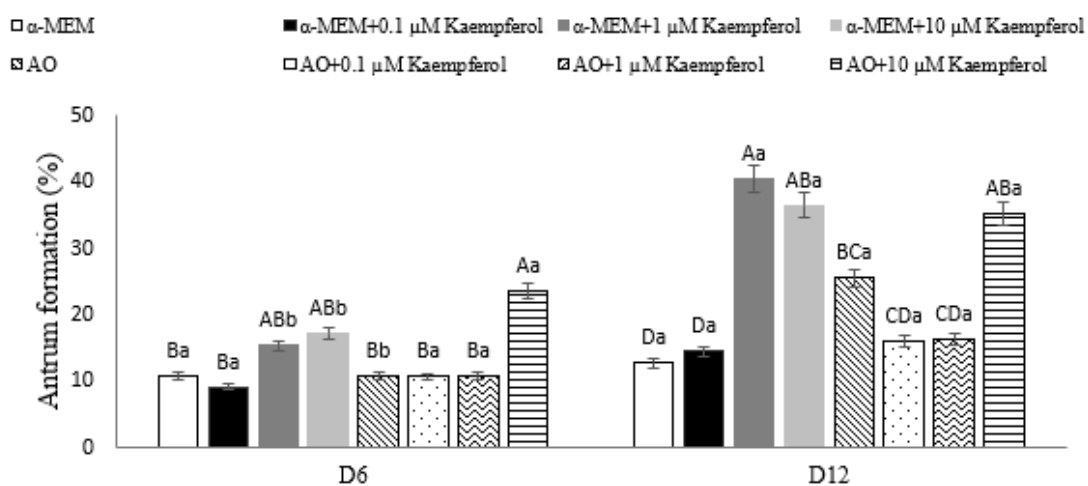


Figure 5 - Follicular diameter (μm) during culture in different media (α -MEM or AO) without or with different concentrations of kaempferol (0.1, 1 or 10 μM).

(A, B, C) Different letters denote significant differences among treatments in the same period ($P < 0.05$); (a, b, c) Different letters denote significant differences among culture periods in the same treatment ($P < 0.05$).

α -MEM: antioxidant free-medium; AO: medium containing antioxidants

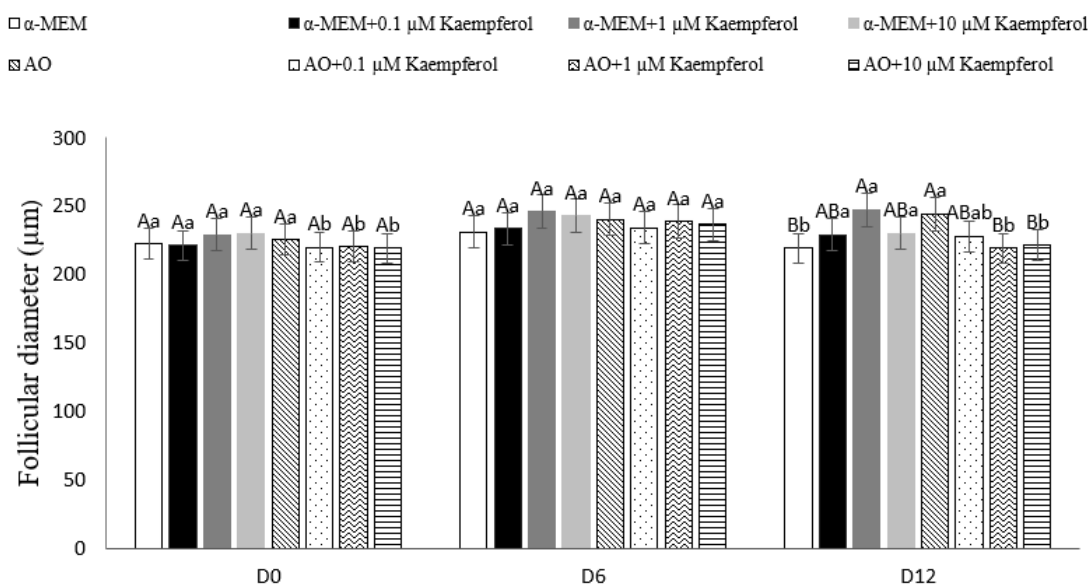


Figure 6 - Percentages of fully grown oocytes after culture of secondary follicles in different media (α -MEM or AO) without or with different concentrations of kaempferol (0.1, 1 or 10 μ M).

(A, B, C) Different letters denote significant differences among treatments ($P < 0.05$).

α -MEM: antioxidant free-medium; AO: medium containing antioxidants

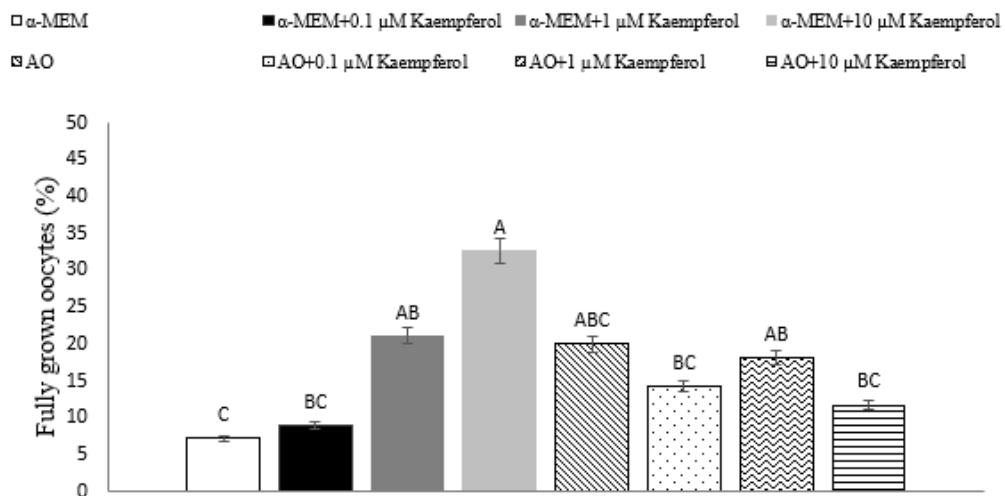


Figure 7 - Epifluorescent photomicrographic images of ovine oocytes showing intracellular levels of GSH (A, B, C), active mitochondria (D, E, F) and (G) Intracellular levels of GSH and active mitochondria in oocytes from different experimental groups. Scale bars: 50 μ m (100x).

(^{A, B}) Bars with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

α -MEM: antioxidant free-medium; AO: medium containing antioxidants.

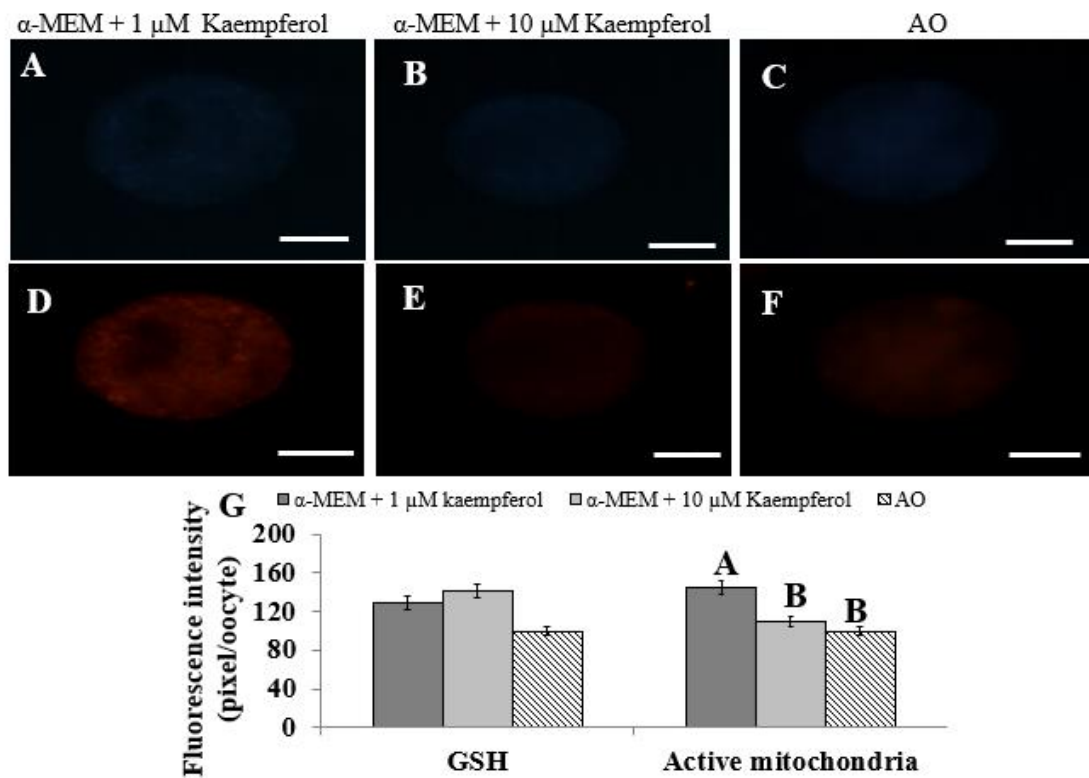
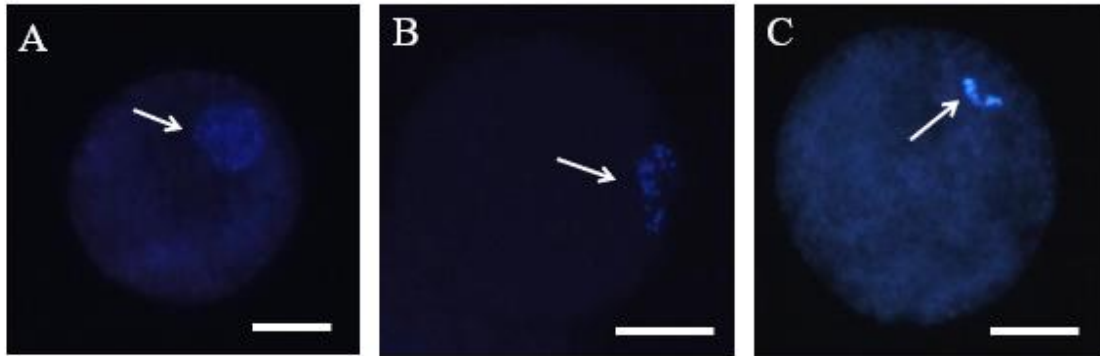


Figure 8- Chromatin configuration of ovine oocytes stained with Hoechst 33342 after IVM. Oocytes in GV (A), GVBD (B) and MI (C) from *in vitro* grown secondary follicles in α -MEM + 1 μ M kaempferol. Scale bars: 50 μ m.



8. CONCLUSÃO

Este trabalho foi o pioneiro a estudar os efeitos do kaempferol no desenvolvimento de folículos ovarianos ovinos cultivados *in vitro*. Foi possível demonstrar que, em uma concentração adequada, o kaempferol possui efeitos benéficos para o desenvolvimento de folículos ovarianos na espécie ovina, a depender do tipo de cultivo *in vitro* utilizado (*in situ* ou isolado).

Após o cultivo de tecido ovariano, observou-se que 10 μM de kaempferol promoveu a ativação de folículos primordiais (através da via de sinalização PI3K/AKT) e reduziu a fragmentação de DNA de folículos pré-antrais ovinos cultivados *in situ*. Além disso, após o cultivo de folículos secundários isolados, o tratamento α -MEM (meio sem antioxidantes) adicionado de 1 μM de kaempferol apresentou resultados semelhantes quando comparado ao meio AO (meio com antioxidantes), quanto aos parâmetros: sobrevivência, diâmetro folicular, percentagem de oócitos totalmente crescidos, bem como apresentou maiores percentagens de formação de antro. Além disso, 1 μM de kaempferol aumentou a atividade mitocondrial e promoveu a retomada da meiose dos oócitos oriundos de folículos secundários crescidos *in vitro*.

De modo geral, esses dados são importantes para aperfeiçoar e otimizar os resultados já alcançados com o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos, auxiliando na posterior produção *in vitro* de embriões ovinos.

9. PERSPECTIVAS

Mais estudos utilizando o kaempferol são necessários para melhorar as taxas de maturação *in vitro* e, conseqüentemente, promover a produção *in vitro* de embriões.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDELAKHI, A.; SALEHNIA, M.; ALLAMEH, A. The effects of different concentrations of sodium selenite on the *in vitro* maturation of preantral follicles in serum-free and serum supplemented media. **J Assis Reprod Gen.**, v. 25, p. 483-488, 2008.

ABIR, R.; FISCH, B.; NAHUN, R.; ORVIETO, E.; NITKE, S.; OKON, E.; BENRAFAEL, Z. Turner`s syndrome and fertility: Current status and possible future projects. **Hum Reprod.**, v. 7, p. 603-610, 2001.

ABIR, R.; NITKE, S.; BEN-HAROUSH, A.; FISCH, B. *In vitro* maturation of human primordial ovarian follicles: Clinical significance, progress in mammals, and methods for growth evaluation. **Histol Histopathol.**, v. 21, p. 887-898, 2006.

AGARWAL, A.; SAID, T.M.; BEDAIWY, M.A.; BANERJEE, J.; ALVAREZ, J.G. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. **Fertil Steril.**, v. 86, n. 3, p. 503-512, 2006.

AGUIAR, F.L.N.; LUNARDI, F.O.; LIMA, L.F.; BRUNO, J.B.; ALVES, B.G.; MAGALHÃES-PADILHA, D.M.; CIBIN, F.W.S.; BERIONI, L.; APGAR, G.A., LO TURCO, E.G.; GASTAL, E.L.; FIGUEIREDO, J.R. Role of EGF on *in situ* culture of equine preantral follicles and metabolomics. **Res Vet Sci.**, v.115, p. 155–164, 2017.

AKONDI, R.B.; AKULA, K.P.A.; PUJARI, M. Protective Effect of Rutin and Naringin on Sperm Quality in Streptozotocin (STZ) Induced Type 1 Diabetic Rats. **Iran J Pharm Res.**, v.10, n. 3, p.585-596, 2011.

ALVES, E.A.; PADILHA, L.; SAVI, P.A.; APPARICIO M.F.; MOSTACHIO, G.Q.; MOTHEO, T.F.; PIRES-BUTTLER, E.A.; VICENTE, W.R.R.; LUVONI,

G.C. In vitro Survival of Follicles Collected from Domestic Cats' Ovaries at Different

Stages of estrous Cycle and Cultured with IGF-1. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 47, p. 109–112, 2012.

AMORIM, C.A. *In vitro* culture of ovarian preantral follicles: a promising alternative for preserving fertility in cancer patients. **Fertil Steril.**, v. 110, n. 6, p. 1041-1042, 2018.

ANDRADE, E.R.; VAN DEN HURK, R.; LISBOA, L.A.; HERTEL, M.F.; MELO-STERZA, F.A.; MORENO, K.; BRACARENSE, A.P.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A. Effects of ascorbic acid on in vitro culture of bovine preantral follicles. **Zygote**, v.4, p. 379-388, 2012.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Ver Inst Adolfo Lutz.**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

ARAUJO, V.R.; GASTAL, M.O.; FIGUEIREDO, J.R.; GASTAL, E.L. In vitro culture of bovinepreantral follicles: a review. **Reprod Biol Endocrinol.**, v.12, p.78, 2014.

ARUNAKUMARI, G.; SHANMUGASUNDARAM, N.; RAO, V.H. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. **Theriogenology**, v.74, p.884-894, 2010.

BAILLET, A.; MANDON-PEPIN, B. Mammalian ovary differentiation - A focus on female meiosis. **Mol Cell Endocrinol.**, v. 356, p.13-23, 2012.

BARBERINO, R.S.; BARROS, V.R.P.; MENEZES, V.G.; SANTOS, L.P.; ARAÚJO, V.R.; QUEIROZ, M.A.A.; ALMEIDA, J.R.G.S.; PALHETA, R.C.; MATOS, M.H.T. Amburana cearensis leaf extract maintains survival and

promotes *in vitro* development of ovine secondary follicles. **Zygote**, v.24, p.277-285, 2015.

BARBOSA, M.R.; SILVA, M.M.A.; ULISSES, L.W.C.; CAMARA, T.R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciênc. Rural**, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.

BERTOLDO M.J.; WALTERS K.A.; LEDGER W.L.; GILCHRIST R.B.; MERMILLOD P.; LOCATELLI Y. In-vitro regulation of primordial follicle activation: challenges for fertility preservation strategies. **Reprod Biomed. Online**, v. 36, n. 5, p. 491-499, 2018.

BEZERRA, M. É. S.; BARBERINO, R. S.; MENEZES, V. G.; GOUVEIA, B. B.; MACEDO, T. J. S.; SANTOS, J. M. S.; MONTE, A. P. O.; BARROS, V. R. P.; MATOS, M. H. T. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) promotes primordial follicle growth and reduces DNA fragmentation through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) signalling pathway. **Reprod Fertil Dev.**, p. 1-11, 2018. DOI: 10.1071/RD17332.

BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Sci.**, v. 16, p. 839–851.

CADENAS, J.; MASIDE, C.; FERREIRA, A.C.A.; VIEIRA, L.A.; LEIVA-REVILLA, J.; PAES, V.M; ALVES, B.G; BRANDÃO, F.Z.; RODRIGUES, A.P.R.; WHEELER, M.B.; FIGUEIREDO, J.R. Relationship between follicular dynamics and oocyte maturation during *in vitro* culture as a non-invasive sign of caprine oocyte meiotic competence. **Theriogenology**, v.107, 95-103, 2018.

CALDERÓN-MONTAÑO, J.M.; BURGOS-MORÓN, E.; PÉREZ-GUERRERO, C.; LÓPEZ-LÁZARO, M. A Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol. **Mini Rev Med Chem.**, v. 11, p. 298-394, 2011.

CASTILHO, A. C. S.; MACHADO, M.F.; DALANEZI, F.; BURATINI JR, J. Envolvimento da subfamília do fator de crescimento fibroblástico 7 (FGF7) no controle da foliculogênese antral em bovinos. **Rev Bras Reprod Anim.**, v. 37, p. 37-44, 2013.

CAVALCANTE, A. Y. P.; BARBERINO, R. S.; GOUVEIA, B. B.; BEZERRA, M. É. S.; MENEZES, V. G.; SOUZA, G. R.; ROLIM, L. A.; ROLIM-NETO, P. J.; ALMEIDA, J. R. G. S.; MATOS, M. H. T. Antiapoptotic activity of *Morus nigra* extract as a preservation medium for sheep ovarian tissue transportation. **Semina: Ciênc Agrár.**, v. 38, p. 1973-1986, 2017.

CAVALCANTE, A.Y.P.; GOUVEIA, B.B.; BARBERINO, R.S.; LINS, T.L.B.G.; SANTOS, L.P.; GONÇALVES, R.J.S.; CELESTINO, J.J.H.; MATOS, M.H.T.; Kit ligand promotes the transition from primordial to primary follicles after in vitro culture of ovine ovarian tissue. **Zygote**, v.24, p.578-582, 2016.

CECCONI, S.; MAURO, A.; CELLINI, V.; PATACCHIOLA, F. The role of Akt signalling in the mammalian ovary. **Int J Dev Bio.**, v. 56, p. 809-817, 2012.

CELESTINO, J. J. H.; LIMA-VERDE, I. B.; BRUNO, J. B.; MATOS, M. H. T.; CHAVES, R. N.; SARAIVA, M.V.A.; SILVA, C.M.G.; FAUSTINO, L.R.; ROSSETTO, R.; LOPES, C.A.P.; DONATO, M.A.M.; PEIXOTO, C.A.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R.V.; FIGUEIREDO J. R. Steady-state level of bone morphogenetic protein-15 in goat ovaries and its influence on in vitro development and survival of preantral follicles. **Mol Cell Endocrinol.**, v. 338 , p.1–9, 2011.

CELIK, H.; ARINC, E. Evaluation of the protective effects of quercetin, rutin, naringenin, resveratrol and trolox against idarubicin-induced DNA damage. **J Pharm Pharm Sci.**, v.13, p.231–41, 2010.

CHE, J.; LIANG, B.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; TANG, J.; SHI, G. Kaempferol alleviates ox-LDL-induced apoptosis by up-regulation of autophagy via

inhibiting PI3K/Akt/mTOR pathway in human endothelial cells. **Cardiovasc Pathol.**, v. 31, p. 57-62, 2017.

CHEN, X.; DENG, Z.; ZHANG, C.; ZHENG, S.; PAN, Y.; WANG, H.; LI, H. Is antioxidant activity of flavonoids mainly through the hydrogenatom transfer mechanism? **Food Res Inter.**, p. 1-55, 2018. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.11.018.

CHO, H. J.; PARK, J. H. Kaempferol induces cell cycle arrest in HT-29 human colon cancer cells. **J Cancer Prev.**, v.18, 3, p. 257–263, 2013.

CHOI, E.M. Kaempferol protects MC3T3-E1 cells through antioxidant effect and regulation of mitochondrial function. **Food Chem Toxicol.**, v. 49, n. 8, p. 1800-1805, 2011.

CONTI, M.; H. M.; HSIEH, M.; ZAMAH, M.A., OH, S.J. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. **Mol Cel Endocrinol.**, v. 356, p. 65-73, 2012.

CORNU, M.; ALBERT, V.; HALL, M.N. mTOR in aging, metabolism and cancer. **Curr Opin Genet Dev.**, v. 23, n. 1, p.53-62, 2013.

DANG, Q.; SONG, W.; XU, D.; MA, Y.; LI, F.; ZENG, J., ZHU, G.; WANG, X.; CHANG, L.S.; HE, D.; LI, L. Kaempferol suppresses bladder cancer tumor growth by inhibiting cell proliferation and inducing apoptosis. **Mol Carcinog.**, v. 54, n. 9, p. 831–840, 2015.

DEMEESTERE, I.; CENTNER, J.; GERVY, Y.; DELBAERE, A. Impact of various endocrine and paracrine factors on *in vitro* culture of preantral follicles in rodents. **Reproduction**, v.130, p.147-156, 2005.

DESAGHER, S., MARTINO, J. Mitochondria as the central control point of apoptosis. **Trends Cell Biol.**, v. 10, n. 9, p. 369-377, 2000.

DIPAZ-BERROCAL, D.J.; SÁ, N.A.R.; GUERREIRO D.D.; CELESTINO, J.J.H.; LEIVA-REVILLA, J.; ALVES, B.G.; ALVES, K.A.; SANTOS, R.R.; CIBIN, F.W.S.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Refining insulin concentrations in culture medium containing growth factors BMP15 and GDF9: An *in vitro* study of the effects on follicle development of goats. **Anim Reprod Sci.**, v.185, p.118-127, 2017.

DRIANCOURT, M.A.; GIBSON, W.R.; CAHILL, L.P. Follicular dynamics throughout the o estrus cycle in sheep. A review. **Reprod. Nutr. Develop.**, v. 25, p.1-15, 1985.

DUPONT, J.; REVERCHON, M.; CLOIX, L.; FROMENT, P.; RAMÉ, C. Involvement of adipokines, AMPK, PI3K and the PPAR signaling pathways in ovarian follicle development and cancer. Intern. **J Dev Biol.**, v. 56, p. 959-967, 2013.

EGHBALIFERIZ, S.; IRANSHAHI, M. Prooxidant activity of polyphenols, flavonoids, anthocyanins and carotenoids: updated review of mechanisms and catalyzing metals. **Phytother Res.**, v. 30, n. 9, 1379-1391, 2016.

EL-SEADAWY, I. EL-S.; EL-NATTAT, W.S.; EL-TOHAMY, M.M.; AZIZA, S.A.H.; EL-SENOSY, Y.A.; HUSSEIN, A.S. Preservability of rabbit semen after chilled storage in tris based extender enriched with different concentrations of Propolis ethanolic extract (PEE). **Asia Pac J Reprod.**, v. 6, n. 2, p. 68-76, 2017.

EPPIG, J.J.; O'BRIEN, M.J. Development *in vitro* of Mouse Oocytes from Primordial Follicles. **Biol Reprod.**, v. 54, p.197-207, 2003.

FAUSTINO, L.R.; LIMA, I.M.T.; CARVALHO, A.A.; SILVA, C.M.G.; CASTRO, S. V.; LOBO, C.H.; LUCCI, C. M.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A. P. R. Interaction between keratinocyte growth factor-1 and

kit ligand on the goat preantral follicles cultured in vitro. **Small Rumin Res.**, v. 114, n. 1, p. 112-119, 2013.

FENG Y.; TAMADON A.; HSUEH, A.J W. Imaging the ovary. **Reprod Biomed Online**. v. 36, n. 5, p.584-593, 2018.

FERRERA, T.S.; HELDWEIN, A.B.; DOS SANTOS, C.O.; SOMAVILLA, J.C.; SAUTTER, C.K. Substâncias fenólicas, flavonoides e capacidade antioxidante em erveiras sob diferentes coberturas do solo e sombreamentos. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.18, n.2, supl. I, p.588-596, 2016.

FIGUEIREDO, J.R.; MATOS, M.H.; LIMA-VERDE, I.B.; LUQUE, M.C.; MAIA, JE, J.R.; SILVA, J.R.; CELESTINO, J.J.; MARTINS, F.S.; BÁO, S.N.; LUCCI, C.M. Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability *in vitro*. **Zygote**, v. 15, p. 173-182, 2007.

FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; SILVA, J.R.V. Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais. **Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal**, 2ª edição, p. 303–327, 2008.

FORTUNE, J.E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Anim Reprod Sci.**, v. 78, p. 135-163, 2003.

FORTUNE, J.E.; CUSHMAN, R.A.; WAHL, C.M.; KITO, S. The Primordial to Primary Follicle Transition. **Mol Cel Endoc.**, v. 163, p. 53-60, 2000.

GAO, M.; WANG, Y.; WU, X. In-vitro maturation of immature oocytes from preantral follicles in prepuberal mice. **J Reprod Contrac.**, v. 18, n. 1, p. 25-32, 2007.

GOUGEON, A. Human ovarian follicular development: From activation of resting follicles to preovulatory maturation. **Ann Endocrinol.**, v. 7, p. 132–143, 2010.

GOUVEIA, B.B.; MACEDO, T.J.; SANTOS, J.M.; BARBERINO, R.S.; MENEZES, V.G.; MÜLLER, M.C.; ALMEIDA, J.R.; FIGUEIREDO, J.R., MATOS, M.H.T. Supplemented base medium containing *Amburana cearensis* associated with FSH improves in vitro development of isolated goat preantral follicles. **Theriogenology**, v. 86, n. 5, p. 1275-1284, 2016.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Rev Bras. Cancerol.**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GUO, Z.; LIAO, Z.; HUANG, L.; LIU, D.; YIN, D.; HE, M. Kaempferol protects cardiomyocytes against anoxia/reoxygenation injury via mitochondrial pathway mediated by SIRT1. **European Journal of Pharmacology**, v. 761, p. 245–253.

GUPTA, P.S.P.; RAMESH, H.S.; MANJUNATHA, B.M.; NANDI, S.; RAVINDRA, J.P. Production of buffalo embryos using oocytes from *in vitro* grown preantral follicles. **Zygote**, v.16, p. 57-63, 2008.

GUZEL, Y.; BILDIK, G.; OKTEM, O. Sphingosine-1-phosphate protects human ovarian follicles from apoptosis in vitro. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.**, v. 222, p.19-24, 2018.

GUZEL, Y.; OKTEM, O. Understanding follicle growth in vitro: Are we getting closer to obtaining mature oocytes from in vitro-grown follicles in human? **Mol Reprod Dev.**, v.84, p.544-59, 2017.

HAAG, K.T.; MAGALHAES-PADILHA, D.M.; FONSECA, G.R.; WISCHRAL, A.; GASTAL, M.O.; KING, S.S.; JONES, K.L.; FIGUEIREDO, J.R.; GASTAL, E.L. Equine preantral follicles obtained via the Biopsy Pick-Up method:

histological evaluation and validation of a mechanical isolation technique.

Theriogenology, v.79, p.735–743, 2013.

HALIMAH, E.; DIANTINI, A.; DESTIANI, D. P.; PRADIPTA, I. S.;
SASTRAMIHARDJA, H. S.; LESTARI, K.; SUBARNAS, A.; ABDULAH, R.;
KOYAMA, H. Induction of caspase cascade pathway by kaempferol-3-O-
rhamnoside in LNCaP prostate cancer cell lines. **Biomed Rep.**, v. 3, n. 1,
p.115–117, 2015.

HAY, N.; SONENBERG, N. Upstream and downstream of mTOR. **Genes
Dev.**, v. 18, n. 6, p. 1926-45, 2004.

HE, X.; TOTH, T.L. *In Vitro* Culture of Ovarian Follicles from *Peromyscus*.
Semin Cell Dev Biol., v.61, p. 140-149, 2017.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-
776, 2000.

HERMIDA, M.A.; DINESH KUMAR, J.; LESLIE, N.R. GSK3 and its interactions
with the PI3K/AKT/mTOR signalling network. **Adv Biol Regul.**, v. 65, p. 5-15,
2017.

HERTOG, M. G. L.; FESKENS, E. J. M.; KROMHOUT, D.; HOLLMAN, P. C.
H.; KATAN, M. B.; KROMHOUT, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of
coronary heart disease: the Zutphen elderly study. **The Lancet**, v. 342, n.
8878, p. 1007-1011, 1993.

HONG, J-T.; YEN, J-H.; WANG, L.; LO, Y-H.; CHEN, Z-T.; WU, M-J.
Regulation of heme oxygenase-1 expression and MAPK pathways in response
to kaempferol and rhamnocitrin in PC12 cells. **Toxicol Appl Pharmacol.** v.
237, p. 59–68, 2009.

HOSSEINI, L.; SHIRAZI, A.; NADERI, M.M.; SHAMS-ESFANDABADI, N.;
BORJIAN-BOROJENI S.; SARVARI, A.; SADEGHNIA, S.; BEHZADI, B.;

AKHONDI, M.M. Platelet-rich plasma promotes the development of isolated human primordial and primary follicles to the preantral stage. **Reprod Biomed.**, v.35, n. 4, p. 343-350, 2017.

HSUEH, A.J.W.; KAWAMURA, K.; CHENG, Y.; FAUSER, B. C. J. M. Intraovarian control of early folliculogenesis. **Endocr Ver.**, v.36, p. 1-24, 2015.

<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2017/default.shtm>, accessed on 19.11.18.

HUTT, K. The role of BH3-only proteins in apoptosis within the ovary. **Reproduction**, v. 149, p. 1470-1626, 2015.

JAMALAN, M.; GHAFFARI, M.A.; HOSEINZADEH, P.; HASHEMITABAR, M.; ZEINALI, M. Human sperm quality and metal toxicants: protective effects of some flavonoids on male reproductive function. **Int J Fertil Steril.**, v. 10, n. 2, p. 215-222, 2016.

JAMWAL, K.; BHATTACHARYA*, S.; PURI, S. Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. **J Appl Res Med Aromat Plants**, p. 1-13, 2017. DOI: 0.1016/j.jarmap.2017.12.003

JANG, H.; LEE, O.H.; LEE, Y.; YOON, H.; CHANG, E.M.; PARK, M., LEE J.W.; HONG, K.; KIM J.O.; KIM, N.K.; KO J.J.; LEE D.R.; YOON, T.K.; LEE, W.S.; CHOI, Y. Melatonin prevents cisplatin-induced primordial follicle loss via suppression of PTEN/AKT/FOXO3a pathway activation in the mouse ovary. **J Pineal Res.**, v. 60, n. 3, p. 336–347, 2016.

JIANG, X.; WANG, X. Cytochrome C-mediated apoptosis. **Annu Rev Biochem.**, v. 73, n. 1, p. 87-106, 2004.

JIANG, Y.; LI C.; CHEN, L.; WANG, F.; ZHOU X. Potential role of retinoids in ovarian physiology and pathogenesis of polycystic ovary syndrome. **Clin Chim Acta**, v. 469, p. 87-93, 2017.

JIN, S.Y.; LEI, L.; SHINAKOV, A.; SHEA, L.D.; WOODRUFF, T.K. A novel two-step strategy for *in vitro* culture of early-stage ovarian follicles in the mouse. **Fertil Steril.**, v. 93, p. 2633-2639, 2010.

JOHN, G. B.; GALLARDO, T. D.; SHIRLEY, L. J.; CASTRILLON, D. H. Foxo3 is a PI3K-dependent molecular switch controlling the initiation of oocyte growth. **Dev Biol.**, v. 321, p. 197–204, 2008.

KASHYAP, D.; SHARMA, A.; TULI, H.S.; SAK, K.; PUNIA, S.; MUKHERJE, T.K. Kaempferol – A dietary anticancer molecule with multiple mechanisms of action: Recent trends and advancements. **J Funct Foods.**, v. 30, p. 203–219, 2017.

KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L. Recent achievements in *in vitro* culture and preservation of ovarian follicles in mammals. **Reprod Biol.**, v. 6, p. 3-16, 2006.

KEATING, A.F.; MARK, C.J.; SEN, N.; SIPES, I.G.; HOYER, P. B. Effect of phosphatidylinositol-3 kinase inhibition on ovotoxicity caused by 4-vinylcyclohexene diepoxide and 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene in neonatal rat ovaries. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 241, n. 2, 127-134, 2009.

KENNA, M.M.; MCGARRIGLE, S.; PIDGEON, GP. The next generation of PI3K-Akt-mTOR pathway inhibitors in breast cancer cohorts. **Biochim Biophys Acta Rev Cancer**, v. 1870, n. 2, p.185-197, 2018.

KEYHANIAN, S.; STAHL-BISKUP, E. Phenolic constituents in dried flowers of aloe vera (*Aloe barbadensis*) and their *in vitro* antioxidative capacity. **Planta Med.**, v.73, p. 599-602, 2007.

KNIGHT, P. G.; GLISTER, C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. **Reproduction**, v. 132, n. 2, p.191–206, 2006.

KUO, W. T.; TSAI, Y. C.; WU, H. C.; HO, Y. J.; CHEN, Y. S.; YAO, C. H.; YAO, C. H. Radiosensitization of non-small cell lung cancer by kaempferol. **Oncol Rep.**, v. 34, n. 5, 2351–2356, 2015.

LAISK-PODAR, T.; LINDGREN, C.M.; PETERS, M.; TAPANAINEN, J.S.; LAMBALK, C.B.; SALUMETS, A.; MÄGI, R. Ovarian Physiology and GWAS: Biobanks, Biology, and Beyond. **Trends Endocrinol Metab.**, v. 27, n. 7, p.516-528, 2016.

LANDE, Y.; FISCH, B.; TSUR, A.; FARHI, J.; PRAG-ROSENBERG, R.; BEM HAROUSH, A.; KESSLER-ICEKSON, G.; ZAHALKA, M.A.; LUDEMAN, S.M.; ABIR R. Short-term exposure of human ovarian follicles to cyclophosphamide metabolites seems to promote follicular activation *in vitro*. **Reprod BioMed Online**, v. 34, n.1, 104-114, 2017.

LAVIN, M. R. Neuroleptic-induced extrapyramidal side effects. **J Psychiatry.**, v. 150, p. 1752-1753, 1993.

LEAL, L; K. A. M.; G.S.B; SILVEIRA, E.R.; CANUTO, K.M.; RIBEIRO, R. A.; NECHIO, M.; FONTENELE, J. B.; Anti-inflammatory and smooth muscle relaxant activities of the hydroalcoholic extract and chemical from *Amburana cearensis*. **Smith.Phytotherapy Research**, USA, v. 17, p. 335-340, 2013.

LEE, G.A.; CHOI, KC.; HWANG, K.A. Kaempferol, a phytoestrogen, suppressed triclosan-induced epithelial-mesenchymal transition and

metastatic-related behaviors of MCF-7 breast cancer cells. **Environ Toxicol Pharmacol.**, v.49., p.48-57, 2017.

LIAO X.; TANG, S.; THRASHER, J. B.; GRIEBLING, T. L.; LI, B. Small-interfering RNA-induced androgen receptor silencing leads to apoptotic cell death in prostate cancer. **Mol Cancer Ther.**, v. 4, n. 4, p. 505-515, 2005.

LIAO, W.;CHEN, L.;MA, X.;JIAO, R.;LI, X.;WANG, Y. Protective effects of kaempferol against reactive oxygen species- induced hemolysis and its antiproliferative activity on human cancer cells. **Eur J Med Chem.**, v, 114, p. 24-32 , 2016.

LIMA, L. F.; BRUNO, J. B.; RODRIGUES, A. P. R.; DE FIGUEIREDO, J. R. Papel da homeopatia na regulação da foliculogênese in vivo e in vitro. **Reprod Climat.**, v. 31, n. 2, p. 112-119, 2016.

LIMA-VERDE, I.B.; BRUNO, J.B.; MATOS, M.H.T.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F. Implicações do estresse oxidativo no ovário e embrião mamífero. **Rev Med Vet.**, v. 1, n. 1, p. 81-88, 2007.

LIN, H.Y.; JUAN, S.H.; SHEN, S.C.; HSU, F.L.; CHEN, Y.C. Inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by flavonoids in RAW264.7 macrophages involves heme oxygenase-1. **Biochem Pharmacol.**, v.66, p.1821-32, 2003.

LIN, H.Y.; CHANG, T.C.; CHANG, S.T.A review of antioxidant and pharmacological properties of phenolic compounds in *Acacia confusa*. **J Trad Complement Med.**, p.1-8, 2018. DOI:10.1016/j.jtcme.2018.05.002

LINS, T. L. B. G.; CAVALCANTE, A. Y. P.; SANTOS, J. M. S.; MENEZES, V. G.; BARROS, V. R. P.; BARBERINO, R. S; BEZERRA, M. É. S.; MACEDO, T. J. S.; MATOS, M. H. T. 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.

LUCCI, C.M.; SILVA, R.V.; CARVALHO, C.A.; FIGUEIREDO, J.R.; BÁO, S.N. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. **Small Rumin Res.**, v. 41, p. 61-69, 2001.

LUZ, V.B.; SANTOS, R.; ARAÚJO, V.R.; CELESTINO, J.J.; MAGALHÃES-PADILHA, D.M.; CHAVES, R.N.; BRITO, I.R.; SILVA, T.F.; ALMEIDA, A.P.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R. The effect of LIF in the absence or presence of FSH on the in vitro development of isolated caprine preantral follicles. **Reprod Domestic Anim.**, v. 47, n. 3, p. 379-384, 2012.

MABUCHI, S.; KURODA, H.; TAKAHASHI, R.; SASANO, T. The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in ovarian cancer. **Gynecol Oncol.**, v. 137, n. 1, p. 173-179, 2015.

MAGALHÃES, D. M.; DUARTE, A. B. G.; ARAÚJO, V. R.; BRITO, I. R.; SOARES, T. G.; LIMA, I. M. T.; LOPES, C. A. P.; CAMPELLO, C. C.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. *In vitro* production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. **Theriogenology**, v. 75, n. 1, p. 182-188, 2011.

MANNING, B.D.; CANTLEY, L.C. AKT/PKB signalling: navigating downstream. **Cell.**, v. 129, n. 7, 1261-74, 2007.

MARTINS, F.S.; CELESTINO, J.J.H.; SARAIVA, M.V.A.; MATOS, M.H.T.; BRUNO, J.B.; ROCHA-JUNIOR, C.M.C.; LIMA-VERDE, I.B.; LUCCI, C.M.; BÁO, S.N.; FIGUEIREDO, J.R.. Growth and differentiation factor-9 stimulates activation of goat primordial follicles in vitro and their progression to secondary follicles. **Reprod Fertil Dev.**, v. 20, p. 916–924, 2008.

MBEMYA, G.T.; VIEIRA, L.A.; CANAFISTULA, F.G.; PESSOA, O.D.L.; RODRIGUES, A.P.R. Reports on in vivo and in vitro contribution of medicinal

plants to improve the female reproductive function. **Reprod Climat.**, v. 32, n. 2, p.109–119, 2017.

MCGEE, E.A.; HSUEH. A.J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocr Rev.**, v. 21, p. 200-214, 2000.

MCLAUGHLIN, M.; TELFER, E. E. Oocyte development in bovine primordial follicles is promoted by activin and FSH within a two-step serum-free culture system. **Reproduction**, v. 139, n. 6, p. 971-978, 2010.

MENEZES, V. G.; SANTOS, J. M. S.; MACEDO, T. J. S.; LINS, T. L. B. G.; BARBERINO, R. S.; GOUVEIA, B. B.; MÉS BEZERRA; CAVALCANTE, A.Y.P.; QUEIROZ, M.A.A.; PALHETA, R.C. J.; MATOS, M. H. T. Use of protocatechuic acid as the sole antioxidant in the base medium for in vitro culture of ovine isolated secondary follicles. **Reprod Domestic Anim.**, v. 52, n. 5, p. 890-898, 2017.

MONNIAUX, D. Driving folliculogenesis by the oocyte-somatic cell dialog: Lessons from genetic models. **Semin Cell Dev Biol.**, v. 61, p. 140-149, 2017.

MYERS, C.R.; MYERS, J.M. The effects of acrolein on peroxiredoxins, thioredoxins, and thioredoxin reductase in human bronchial epithelial cells. **Toxicology**, v. 257, p. 95–104, 2009.

NANDI, S.; TRIPATHI, S.K.; GUPTA, P.S.P.; MONDAL, S.; Effect of metabolic stressors on survival and growth of in vitro cultured ovine preantral follicles and enclosed oocytes. **Theriogenology.**, v. 104, p. 80-86, 2017.

NILSSON, E.E.; SCHINDLER, R.; SAVENKOVA, M.I.; SKINNER, M.K. Inhibitory actions of anti-mullerian hormone (AMH) on ovarian primordial follicle assembly. **Plos One**, v. 6, n. 5, 2011.

DOI:10.1371/journal.pone.0020087

NOWAK, B.; MATUSZEWSKA, A.; NIKODEM, A.; FILIPIAK, J.;
LANDWÓJTOWICZ, M.; SADANOWICZ, E.; JEDRZEJUK, D.; RZESZUTKO,
M.; ZDUNIAK, K.; PIASECKI, T.; KOWALSKI, P.; DZIEWISZEK, W.;
MERWID-L.A.; TROCHA, M.; SOZAŃSKI, T.; KWIATKOWSKA, J.;
BOLANOWSKI, M.; SZELAG. A Oral administration of kaempferol inhibits
bone loss in rat model of ovariectomy-induced osteopenia. **PHAREP 720**, 1-
22, 2017. DOI: doi:10.1016/j.pharep.2017.05.002.

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

ORCY, R.B.; SCHROEDER, S.; MARTINS-COSTA, S.H.; RAMOS, J.G.;
SCHECHINGER, W.; KLEIN, H.; BRUM, I.S.; VON EYE CORLETA, H.; CAPP,
E. Signalization of Akt/PKB in the placenta, skeletal muscle and adipose tissue
of preeclampsia patients. **Gynecol Obstet Invest.**, v. 66, n. 4, p.231-6, 2008.

ORLOVSCHI, D.; MICLEA, I.; ZAHAN, M.; MICLEA, V. Effect of Kaempferol
on *in vitro* maturation of porcine oocytes. **J Anim Sci Biotechnol.**, v. 47, n. 2,
p. 108-110, 2014.

ORRENIUS, S.; KAMINSKY, V.O.; ZHIVOTOVSKY, B. Autophagy in
Toxicology: Cause or Consequence? **Annu Rev Pharmacol Toxicol.**, v. 53,
p. 275-297, 2013.

OUYANG, ZH.; WANG, WJ.; YAN, YG.; WANG, B.; LV, GH. The PI3K/Akt
pathway: a critical player in intervertebral disc degeneration. **Oncotarget**, v. 8,
p. 57870–57881, 2017.

PICTON, H.M.; HARRIS, S.E.; MURUVI, W.; CHAMBERS, E.L. The *in vitro*
growth and maturation of follicles. **Reproduction**, v. 136, p. 703-715, 2008.

REGAN, S.L.; KNIGHT, P.G.; YOVICH, J.L.; STANGER, J.D.; LEUNG, Y.; ARFUSO, F.; DHARMARAJAN, A.; ALMAHBOBI, G. Infertility and ovarian follicle reserve depletion are associated with dysregulation of the FSH and LH receptor density in human antral follicles. **Mol Cell Endocrinol.**, v. 446, p.40-5, 2017.

RICHARDS, J.S.; PANGAS, S.A. The ovary: basic biology and clinical implications. **J Clin Investigat.**, v. 120, n. 4, p. 963-972, 2010.

RIZOV, M.; ANDREEVA, P.; DIMOVA, I. Molecular regulation and role of angiogenesis in reproduction. **Taiwan J Obstet Gynecol.**, v.56, n. 2, p.127-132, 2017.

RODRIGUES, G. Q.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; BRUNO, J. B.; MAGALHÃES, D. M.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Bovine serum albumin improves in vitro development of caprine preantral follicles. **Anim Reprod.**, v. 7, n. 4, p. 382-388, 2010.

ROSSETTO, R. **Efeito do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-I), meio de base, da insulina e FSH sobre o desenvolvimento in vitro de folículos pré-antrais bovinos isolados.** 121f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2013.

ROSSETTO, R.; LIMA-VERDE, I.B.; MATOS, M.H.T.; SARAIVA, M.V.A.; MARTINS, F.S.; FAUSTINO, L.R.; ARAÚJO, V.R.; SILVA, C.M.G.; NAME, K.P.O.; BÃO, S.N.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R.; BLUME, H. Interaction between ascorbic acid and follicle-stimulating hormone maintains follicular viability after long-term *in vitro* culture of caprine preantral follicles. **Domest. Anim Endocrinol.**, v. 37, p. 112-123, 2009.

RUIZ, E.; PADILLA, E.; REDONDO, S.; GORDILLO-MOSCOSO, A.; TEJERINA, T. Kaempferol inhibits apoptosis in vascular smooth muscle

induced by a component of oxidized LDL. **Eur J Pharmacol.**, v. 529, p. 79-83, 2006.

RUPNARAIN, C.; DLAMINI, Z.; NAICKER, S.; BHOOLA, K. Colon cancer: genomics and apoptotic events. **J. Biol Chem.**, v. 385, n. 6, p. 449-464, 2004.

SÁ, N.A.R.; ARAÚJO, V.R.; CORREIA, H.H.V.; FERREIRA, A.C.A.; GUERREIRO, D.D.; SAMPAIO, A.M.; ESCOBAR, E.; SANTOS, F.W.; MOURA, A.A.; LÔBO, C.H.; CECCATTO, V.M.; CAMPELLO, C.C.; RODRIGUES, A.P.R.; LEAL-CARDOSO, J.H.; FIGUEIREDO, JR. Anethole improves the in vitro development of isolated caprine secondary follicles. **Theriogenology**, v.89, p. 226-234, 2017.

SANTOS, J.M.; MENEZES, V.G.; BARBERINO, R.S.; MACEDO, T.J.; LINS, T.L.; GOUVEIA, B.B.; BARROS, V.R.; SANTOS, L.P.; GONÇALVES, R.J.; MATOS, M.H. Immunohistochemical Localization of Fibroblast Growth Factor-2 in the Sheep Ovary and its Effects on Pre-antral Follicle Apoptosis and Development In Vitro. **Reprod Domestic Anim.**, v. 49, p. 522–528, 2014.

SANTOS, L.P.; SANTOS, J.M.S.; MENEZES, V.G.; BARBERINO, R.S.; GOUVEIA, B.B.; CAVALCANTE, A.Y.P.; LINS, T.L.B.G.; GONÇALVES, R.J.S., CELESTINO, J.J.H., MATOS, M.H.T. Blocking the PI3K pathway or the presence of high concentrations of EGF inhibits the spontaneous activation of ovine primordial follicles in vitro. **Anim Reprod.**, v. 14, p. 1298-1306, 2017.

SARAIVA, M.V.A.; ROSSETTO, R.; BRITO, I.R.; CELESTINO, J.J.H.; SILVA, C.M.G.; FAUSTINO, L.R.; ALMEIDA, A.P.; BRUNO, J.B.; MAGALHÃES, D.M.; MATOS, M.H.T.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J. R. Dynamic medium produces caprine embryo from preantral follicles grown in vitro. **Reprod Sci.**, v. 17, p.1135-1143, 2010.

SAXENA, M.; SAXENA, J.; NEMA, R.; DHARMENDRA SINGH, D; GUPTA A. Phytochemistry of medicinal plants. **J PharmacognPhytochem.**, v. 1, p.168–182.

SAW, C. L.; GUO, Y.; YANG, A. Y.; PAREDES-GONZALEZ, X.; RAMIREZ, C.; PUNG, D.; KONG, A. N. The berry constituents quercetin, kaempferol, and pterostilbene synergistically attenuate reactive oxygen species: Involvement of the Nrf2-ARE signaling pathway. **Food Chem Toxicol.**, v. 72, p. 303–311, 2014.

SHEA, L.D.; WOODRUFF, T.K.; SHIKANOV, A.; Bioengineering the ovarian follicle microenvironment. **Annu Rev Biomed Eng.**, v. 16, p. 29-52, 2014.

SHRIVASTAVA, R.; ASIF, M.; SINGH, V.; DUBEY, P.; AHMAD, MALIK, S.; LONE, MU.; TEWARI, BN.; BAGHEL, KS.; PAL, S.; NAGAR, GK.; CHATTOPADHYAY, N.; BHADAURIA, S. M2 polarization of macrophages by Oncostatin M in hypoxic tumor microenvironment is mediated by mTORC2 and promotes tumor growth and metastasis. **Cytokine.**, v.18, p.1043-4666, 2018.

SILVA, A. M. S.; BRUNO, J. B.; LIMA, L. F.; SÁ, N. A. R.; LUNARDI, F. O.; FERREIRA, A. C.; RODRIGUES, A. P. R. Connexin 37 and 43 gene and protein expression and developmental competence of isolated ovine to the in vitro maturation of prepubertal bovine oocytes on cytoplasmic maturation and embryo development. **Theriogenology**, v. 74, p.1341–1348, 2016.

SILVA, A.W.B; RIBEIRO, R.P; MENEZES, V.G; BARBERINO, R.S; PASSOS, J.R.S; DAU, A.M.P; COSTA, J.J.N; MELO, L.R.F; BEZERRA, F.T.G; DONATO, M.A.M; PEIXOTO, C.A; MATOS, M.H.T; GONÇALVES, P.B.D; VAN DEN HURK, R; SILVA, J.R.V. Expression of TNF- α system members in bovine ovarian follicles and the effects of TNF- α or dexamethasone on preantral follicle survival, development and ultrastructure in vitro. **Anim Reprod Sci.**, v.182, n. 56-68, 2017.

SILVA, C.M.G.; FAUSTINO, L.R.; SARAIVA, M.V.A.; ROSSETTO, R.; FIGUEIREDO, J.R. Influência da tensão de oxigênio na maturação oocitária e cultivo *in vitro* de folículos e embriões. **Ver Bras Reprod Anim.**, v. 34, p. 233-242, 2010.

SILVA, G.M.; ARAÚJO, V.R.; DUARTE, A.B.G.; CHAVES, R.N.; SILVA, C.M.G.; LOBO, C.H.; ALMEIDA, A.P.; MATOS, M.H.T.; TAVARES, L.M.T.; CAMPELO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R. Ascorbic acid improves the survival and *in vitro* growth of isolated caprine preantral follicles. **Anim Reprod.**, v. 8, p. 14-24, 2011.

SILVA, G.M.; BRITO, I.R.; VENDAS, A.D.; AGUIAR, F.L.N.; DUARTE, A.B.G.; ARAÚJO, V.R.; VIEIRA, L.A.; MAGALHÃES-PADILHA, D.M.; LIMA, L.F.; ALVES, B.G.; SILVEIRA, L.B.R.; LO TURCO, E.G.; RODRIGUES, A.P.; CAMPELO, C.C.; WHEELER, M.B.; FIGUEIREDO, J.R. In vitro growth and maturation of isolated caprine preantral follicles: Influence of insulin and FSH concentration, culture dish, coculture, and oocyte size on meiotic resumption. **Theriogenology**, v.90, p. 32–41, 2017.

SILVA, J.R.V.; VAN DEN HURK, R.; COSTA, S.H.F.; ANDRADE, E.R.; NUNES, A. P.A.; FERREIRA, F.V.A.; LÔBO, R.N.B.; FIGUEIREDO, J.R. Survival and growth of goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. **Anim Reprod Sci.**, v. 81, p. 273-286, 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. **Domest Anim Endocrinol.**, v. 55, 23-135, 2016.

SILVA, R. A.; ZAMBUZZI, W.; ZAMBUZZI, F.; RIBEIRO, M.; SOUZA, A.C. Queratinócitos e seus desafios: uma revisão da literatura sobre mecanismos intracelulares. **Saúde em revista**, v.13, n. 35, 2013.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/ Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ Da Universidade Federal de Santa Catarina, 2010, 1102 p.

SMITZ, J.; DOLMANS, M.M.; DONNEZ, J.; FORTUNE, J.E.; HOVATTA, O.; JEWGENOW, K.; PICTON, H.M.; PLANCHA, C.; SHEA, L.D.; STOUFFER, R.L.; TELFER, E.E.; WOODRUFF, T.K.; ZELINSKI, M.B. Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, *in vitro* follicle development and transplantation: implications for fertility preservation. **Hum Reprod Update.**, v. 16, p. 395-414, 2010.

SMITZ, J.E.J.; CORTVRINDT, R.G. The earliest stages of folliculogenesis *in vitro*. **Reproduction**, v. 123, n. 2, p.185-202, 2002.

SOBINOFF, A.P.; NIXON, B.; ROMAN, S.D.; MCLAUGHLIN, E.A. Staying alive: PI3K pathway promotes primordial follicle activation and survival in response to 3MC-induced ovotoxicity. **Toxicol Sci.**, v. 128, n. 1, p. 258-271, 2012.

SOMERSET, S. M.; JOHANNOT, L. Dietary flavonoid sources in Australian adults. **Nutr Cancer**, v. 60, p. 442–449, 2008.

SONG, H.; BAO, J.; WEI, Y.; CHEN, Y.; MAO, X., LI, J., YANG, Z.; XUE, Y. Kaempferol inhibits gastric cancer tumor growth: An *in vitro* and *in vivo* study. **Oncol Rep**, v. 33, 2, p. 868–874, 2015.

SONG, W.; DANG, Q.; XU, D.; CHEN, Y.; ZHU, G.; WU, K.; ... LI, L. Kaempferol induces cell cycle arrest and apoptosis in renal cell carcinoma through EGFR/ p38 signaling. **Oncol Rep.**, v. 31, n. 3, 1350–1356, 2014.

- SURRAI, P.F.; FISININ, V.I.; KARADAS, F.; Antioxidant systems in chick embryo development. Part 1. Vitamin E, carotenoids and selenium. **Anim Nutr**, v.2: p.1-11, 2016.
- TELFER, E.E.; MCLAUGHLIN, M.; DING, C.; THONG, K.J. A two step serum free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. **Hum Reprod.**, v. 23, p. 1151-1158, 2008.
- TERREAUX, C.; WANG, Q.; IOSET, J.R.; NDJOKO, K.; GRIMMINGER, W.; HOSTETTMANN, K. Complete LC/MS analysis of a Tinneveli senna pod extract and subsequent isolation and identification of two new benzophenone glucosides. **Planta Med.**, v.68, p.349-354, 2002.
- TOH, M.F.; SOHN, J.; CHEN, S.N.; YAO, P.; BOLTON, J.L.; BURDETTE, J.E. Biological characterization of non-steroidal progestins from botanicals used for women's health. **Steroids**, v.77, p. 765-773, 2012.
- TREMELLEN, K. Oxidative stress and male infertility: a clinical perspective. **Hum Reprod Update.**, v.14, p.243–58, 2008.
- UCHIYAMA, Y. Apoptosis: The history and trends of its studies. **Arch Histol Cytol.**, v. 58, p. 127-137, 1995.
- VABRE, P.; GATIMEL, N.; MOREAU, J.; GAYRARD, V.; PICARD-HAGEN N.; PARINAUD, J.; LEANDRI, R.D . Environmental pollutants, a possible etiology for premature ovarian insufficiency: a narrative review of animal and human data. **Environ Health.**, v.16, n. 1, p. 37, 2017.
- VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, p.1717-1751, 2005.

WANDJI, S.A.; SRSEN, V.; NATHANIELSZ, P.W.; EPPIG, J.J.; FORTUNE, J.E. Initiation of growth of baboon primordial follicles *in vitro*. **Hum Reprod.**, v. 12, p. 1993-2001, 1997.

WANG, X.; CATT, S.; PANGESTU, M.; TEMPLE-SMITH, P. Successful *in vitro* culture of pre-antral follicles derived from vitrified murine ovarian tissue: oocyte maturation, fertilization, and live births. **Reproduction**, v.141, p.183-91, 2011.

WEAR, H.M.; MCPIKE, M.J.; WATANABE, K.H. From primordial germ cells to primordial follicles: a review and visual representation of early ovarian development in mice. **J. Ovarian Res.**, v.9, p.36, 2016.

WU, J.; TIAN, Q. Role of follicle stimulating hormone and epidermal growth factor in the development of porcine preantral follicle *in vitro*. **Zygote**, v. 15, p. 233-240, 2007.

XIAO, J.; SUN, GUI-BO.; SUN, B.; WU, Y.; HE, L.; WANG, X.; CHEN, RONG-CHANG; CAO, L.; REN, XIAO-YU.; SUN, XIAO-BO. Kaempferol protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity *in vivo* and *in vitro*. **Toxicology**, v. 292, p. 53- 62, 2012.

XU, J.; XU, M.; BERNUCI, M.P.; FISHER, T.E.; SHEA, L.D.; WOODRUFF, T.K.; ZELINSKI, M.B.; STOUFFER, R.L. Primate follicular development and oocyte maturation *in vitro*. **Adv Exp Med Biol.**, v. 761, p.43–67, 2013.

YAO, S.; WANG, X.; LI, C.; ZHAO, T.; JIN, H.; FANG, W. Kaempferol inhibits cell proliferation and glycolysis in esophagus squamous cell carcinoma via targeting EGFR signaling pathway. **Tumour Biol.**, v. 37, n. 8, 10247–10256, 2016.

YASUHARA, S.; ZHU, Y.; MATSUI, T.; TIPIRNENI, N.; YASUHARA, Y.; KANEKI, M.; ROSENZWEIG, A.; MARTYN, J. A. Comparison of comet assay,

electron microscopy, and flow cytometry for detection of apoptosis. **J.**

Histochem Cytochem., v. 51, p. 873-885, 2003.

ZAYNAB M.; FATIMA M.; ABBAS, S.; HARIF, Y.; UMAIR, M.; ZAFAR, MH.; BAHADAR, K. Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. **Microb Pathog.**, v. 124, p.198-202, 2018.

ZHANG, K; GU, L; CHEN, J; ZHANG, Y; JIANG,Y; ZHAO,L; BI, K; CHEN X . Fucoxanthin ameliorates hyperglycemia, hyperlipidemia and insulin resistance in diabetic mice partially through IRS-1/PI3K/Akt and AMPK pathways. **J Funct Foods**, v. 48, p. 515–524, 2018

ZHANG, R.; AI, X.; DUAN, Y.; XUE, M.; HE, W.; WANG, C.; XU, T.; XU, M.; LIU, B.; LI, C.; WANG, Z.; ZHANG, R.; WANG, G.; TIAN, S.; LIU, H. Kaempferol ameliorates H9N2 swine influenza virus-induced acute lung injury by inactivation of TLR4/MyD88-mediated NF- κ B and MAPK signaling pathways. **Biomed Pharmacother.**, v. 89, p. 660-672, 2017.

ZHANG, Y.; Chen, A. Y.; Li, M.; Chen, C.; Yao, Q. Ginkgo biloba extract kaempferol inhibits cell proliferation and induces apoptosis in pancreatic cancer cells. **J Surg Res.**, v. 148, n. 1, p. 17–23, 2008.

ZHAO, Y.; ZHANG, Y.; LI, J.; ZHENG, N.; XU, X.; YANG, J.; XIA, G.; ZHANG, M. MAPK3/1 participates in the activation of primordial follicles through mTORC1-KITL signaling. **J Cell Physiol.**, v. 233, p.226-237, 2017.

ZHOU, S.; YAN, W.; SHEN, W.; CHENG, J.; XI, Y.; YUAN, S.; ... ANG, S. (2018). Low expression of SEMA6C accelerates the primordial follicle activation in the neonatal mouse ovary. **J Cell Mol Med.**, v. 22, p. 486–496, 2018.

ZHU, J; TANG, H; ZHANG, Z; ZHANG, Y; QIU, C; ZHANG, L; HUANG, P; LI, F; Kaempferol slows intervertebral disc degeneration by modifying LPS-

induced osteogenesis/adipogenesis imbalance and inflammation response in BMSCs. **Int Immunopharmacol.**, v. 43: 236-242, 2017.

ZOHEIR, K.M.; HARISA, G.I.; ALLAM, A.A.; YANG, L.; LI X, LIANG A, ABD-RABOU AA, HARRATH AH. Effect of alpha lipoic acid on in vitro development of bovine secondary preantral follicles. **Theriogenology.**, v.88, p.124-130, 2017.

11. ANEXOS

ANEXO 1

Comprovante de submissão do manuscrito: “Kaempferol promotes primordial follicle activation through the PI3K/AKT signaling pathway and reduces DNA fragmentation of sheep preantral follicles cultured *in vitro*”



Kaempferol promotes primordial follicle activation through the PI3K/AKT signaling pathway and reduces DNA fragmentation of sheep preantral follicles cultured in vitro

| | |
|-------------------------------|---|
| Journal: | <i>Molecular Reproduction and Development</i> |
| Manuscript ID | MRD-18-0025.R1 |
| Wiley - Manuscript type: | Research Article |
| Date Submitted by the Author: | n/a |
| Complete List of Authors: | Santos, Jamile Maiara; Nucleus of Biotechnology Applied to Ovarian Follicle Development, Federal University of São Francisco Valley Lins, Thae; Nucleus of Biotechnology Applied to Ovarian Follicle Development, Federal University of São Francisco Valley Barberino, Ricassio; Universidade Federal do Vale do São Francisco, Nucleus of Biotechnology Applied to Ovarian Follicle Development Menezes, Vanuzia; Federal University of the São Francisco Valley (UNIVASF), Nucleus of Biotechnology Applied to Ovarian Follicle Development Gouveia, Bruna; Nucleus of Biotechnology Applied to Ovarian Follicle Development, Federal University of São Francisco Valley Matos, Maria Helena; Universidade Estadual do Ceará (UECE), Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) |
| Keywords: | Flavonoid, Ovary, Folliculogenesis, pAKT, Tunel |

De: MRD Editorial Office <onbehalf@manuscriptcentral.com>

> Data: 19 de julho de 2018 20:13:12 BRT

> Para: htmatos@yahoo.com

> Assunto: MRD-18-0025.R1 successfully submitted

> Responder A: mrdeditorial@wiley.com

>

> 19-Jul-2018

>

Dear Dr. Matos,

>

> Your manuscript entitled "Kaempferol promotes primordial follicle activation through the PI3K/AKT signaling pathway and reduces DNA fragmentation of sheep preantral follicles cultured in vitro" has been successfully submitted online to Molecular Reproduction and Development. Once all of file and formatting details have been reviewed for compliance with the Author guidelines, your manuscript will be given full consideration for publication by the Editorial Board.

>

> You can view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging into <https://mc.manuscriptcentral.com/mrd>. If you have difficulty using this site, please click the 'Get Help Now' link at the top right corner of the site.

>

> Thank you for submitting your manuscript to Molecular Reproduction and Development.

>

> Sincerely,

> Molecular Reproduction and Development Editorial Office

ANEXO 2

Comprovante de submissão do manuscrito: “Kaempferol can be used as the single antioxidant in the in vitro culture medium of ovine isolated secondary follicles: effects on development, mitochondrial activity and meiotic resumption”

Theriogenology Elsevier Editorial System(tm) for
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Kaempferol can be used as the single antioxidant in the in vitro culture medium of ovine isolated secondary follicles: effects on development, mitochondrial activity and meiotic resumption

Article Type: Original Research Article

Keywords: Flavonoid; Oocyte; Sheep; Survival

Corresponding Author: Professor Maria Helena Tavares Matos, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Federal University of São Francisco Valley

First Author: Jamile Santos

Order of Authors: Jamile Santos; Alane Monte; Thae Lins; Ricássio Barberino; Vanúzia Menezes; Bruna Gouveia; Taís Macedo; Nathalie Donfack; Maria Helena Tavares Matos, Ph.D.

De: "eesserver" <eesserver@eesmail.elsevier.com>

Para: "helena.matos" <helena.matos@univasf.edu.br>, "htmatos" <htmatos@yahoo.com>

Enviadas: Terça-feira, 20 de novembro de 2018 23:20:17

Assunto: Thank you for your submission to Theriogenology

*** Automated email sent by the system ***

Dear Professor Matos,

Thank you for sending your manuscript Kaempferol can be used as the single antioxidant in the in vitro culture medium of ovine isolated secondary follicles:

effects on development, mitochondrial activity and meiotic resumption for consideration to *Theriogenology*. Please accept this message as confirmation of your submission.

When should I expect to receive the Editor's decision?

We publicly share the average editorial times for *Theriogenology* to give you an indication of when you can expect to receive the Editor's decision. These can be viewed here: http://journalinsights.elsevier.com/journals/0093-691X/review_speed

What happens next?

Here are the steps that you can expect as your manuscript progresses through the editorial process in the Elsevier Editorial System (EES).

1. First, your manuscript will be assigned to an Editor and you will be sent a unique reference number that you can use to track it throughout the process. During this stage, the status in EES will be "With Editor".
2. If your manuscript matches the scope and satisfies the criteria of *Theriogenology*, the Editor will identify and contact reviewers who are acknowledged experts in the field. Since peer-review is a voluntary service, it can take some time but please be assured that the Editor will regularly remind reviewers if they do not reply in a timely manner. During this stage, the status will appear as "Under Review".

Once the Editor has received the minimum number of expert reviews, the status will change to "Required Reviews Complete".

3. It is also possible that the Editor may decide that your manuscript does not meet the journal criteria or scope and that it should not be considered further. In this case, the Editor will immediately notify you that the manuscript has been rejected and may recommend a more suitable journal.

For a more detailed description of the editorial process, please see Paper Lifecycle from Submission to Publication:

http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/160/p/8045/

How can I track the progress of my submission?

You can track the status of your submission at any time at

<http://ees.elsevier.com/THERIO>

Once there, simply:

1. Enter your username: Your username is: helena.matos@univasf.edu.br

If you need to retrieve password details, please go to:

http://ees.elsevier.com/THERIO/automail_query.asp

2. Click on [Author Login]. This will take you to the Author Main Menu
3. Click on [Submissions Being Processed]

Many thanks again for your interest in Theriogenology.

Kind regards,

Dr. Fulvio Gandolfi

If you require further assistance, you are welcome to contact our Researcher Support team 24/7 by live chat and email or 24/5 by phone:

<http://support.elsevier.com>