



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO  
CURSO DE PÓS - GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS  
NO SEMIÁRIDO**

**TAÍS JOBARD SILVA E MACEDO**

**EFEITO DO RESVERATROL SOBRE O  
DESENVOLVIMENTO *IN VITRO*, APOPTOSE E ATIVIDADE  
METABÓLICA DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIOS OVINOS**

**PETROLINA-PE**

**2015**

**TAÍS JOBARD SILVA E MACEDO**

**EFEITO DO RESVERATROL SOBRE O  
DESENVOLVIMENTO IN VITRO, APOPTOSE E ATIVIDADE  
METABÓLICA DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS OVINOS**

Trabalho apresentado a Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Campus Ciências Agrárias, como requisito da obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias no Semiárido.

Orientador: Profa. Dra. Maria Helena Tavares de Matos

**PETROLINA-PE**

**2015**

	Macedo, Taís Jobard Silva
M141e	Efeito do resveratrol sobre o desenvolvimento <i>in vitro</i> , apoptose e atividade metabólica de folículos pré-antrais ovinos / Taís Jobard Silva e Macedo – Petrolina, 2015.
	93 f.: il.; 29 cm
	Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias no Semiárido) - Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Campus Ciências Agrárias, 2015.
	Orientadora: Profa. Dra. Maria Helena Tavares de Matos.
	Referências.
	1. Resveratrol. 2. Ovinos - Folículos pré-antrais. 3. Apoptose. I. Título. II. Universidade Federal do Vale do São Francisco.
	CDD: 636.0824

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIAS  
NO SEMIÁRIDO**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Taís Jobard Silva e Macedo

**Efeito do Resveratrol sobre o Desenvolvimento In Vitro, Apoptose e  
Atividade Metabólica de Folículos Pré-antrais Ovinos**

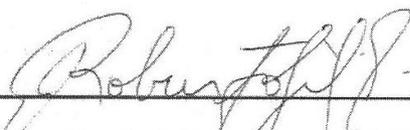
Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias no Semiárido, pela Universidade Federal do Vale do São Francisco

Aprovada em: 31 de julho de 2015.

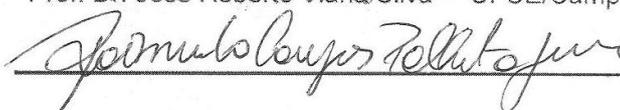
**Banca Examinadora**



Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Maria Helena Tavares de Matos – CMVET/Univasf



Prof. Dr. José Roberto Viãna Silva – UFCE/Campus Sobral



Prof. Dr. Raimundo Campos Palheta Júnior – CMVET/Univasf

## **Dedicatória**

**À minha família...  
Dedico com muito amor.**

## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer à Deus e ao meu anjo guardião pela proteção e por me intuírem ao caminho do bem. À minha família, meu centro essencial, meu maior tesouro, o meu muito obrigada. Agradeço pelos ensinamentos e por me encorajarem a alcançar os meus objetivos. Vocês me ensinaram a honestidade, perseverança, o amor, e, principalmente, a humildade. Eu amo vocês.

Aos meus irmãos, Alan e Daniela, pela força, pelos conselhos e por sempre querer o meu bem. Muito obrigada.

Ao meu companheiro, João, por sempre estar ao meu lado, pela paciência e amor. Eu te amo e hoje somos um só.

Agradeço a todo grupo de pesquisa Biotecnologia Aplicada ao Desenvolvimento de Foliculos Ovarianos (BIOFOV) por fazer da nossa segunda casa (laboratório) um lugar bastante agradável e cordial. Pela ajuda no desenvolver do experimento, conversas e momentos bastante agradáveis. Sem vocês eu não conseguiria chegar até aqui. Vocês são minha segunda família.

À nossa líder e orientadora, professora Maria Helena, eu agradeço pela orientação todos esses anos. A senhora é um exemplo de mulher, disciplina e determinação. Ensinou-me a não desistir de mim mesma, aconselhou-me e o mais importante, compreendeu as minhas dificuldades e os momentos delicados por que passei. O meu muito obrigada professora.

À Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF) e ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias no Semiárido (CPGCV) pela capacitação profissional que me proporcionaram. A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do estado de Pernambuco (FACEPE) pelo financiamento do projeto e incentivo concedido na forma de bolsa de estudo.

Enfim, gostaria de agradecer a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que eu conseguisse galgar mais um degrau da escada da vitória.

## RESUMO

O resveratrol tem emergido como um composto natural com imenso potencial terapêutico. Pode atuar como um antioxidante contra o estresse oxidativo em diferentes células, no entanto, o resveratrol nunca foi utilizado no cultivo de folículos pré-antrais. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do resveratrol sobre a viabilidade, apoptose e desenvolvimento de folículos secundários ovinos isolados, bem como, o nível intracelular de GSH e atividade mitocondrial. Após a coleta dos ovários, folículos secundários foram isolados e cultivados por 18 dias em meio  $\alpha$ -MEM+ suplementado com BSA, insulina, transferrina, selênio, glutamina, hipoxantina e ácido ascórbico (meio controle) ou em meio suplementado com diferentes concentrações de resveratrol (2,0; 10,0 ou 30,0  $\mu$ M). Os parâmetros analisados foram morfologia, formação de antro, diâmetro, taxa de crescimento, apoptose através da técnica de TUNEL, níveis de GSH e atividade mitocondrial. Todos os grupos de resveratrol diminuíram significativamente a porcentagem de folículos morfologicamente normais no dia 18 comparado com o grupo controle ( $\alpha$ -MEM+). A formação de antro foi maior em folículos cultivados em  $\alpha$ -MEM+ sozinho ou adicionado de 2  $\mu$ M de resveratrol do que aqueles folículos cultivados na presença de 10  $\mu$ M de resveratrol. Além disso, os folículos cultivados com 30  $\mu$ M resveratrol mostraram maior porcentagem de oócitos apoptóticos quando comparados ao grupo controle. Oócitos de folículos tratados com 10 e 30  $\mu$ M resveratrol diminuíram significativamente os níveis intracelulares de GSH comparados com 2  $\mu$ M resveratrol. Além disso, folículos cultivados em  $\alpha$ -MEM+ (controle) mostraram maior atividade mitocondrial do que folículos cultivados com 10 e 30  $\mu$ M resveratrol. Em conclusão, esse estudo mostrou que o resveratrol, em altas concentrações, diminua a viabilidade folicular e promove apoptose no oócito, após cultivo in vitro de folículos secundários ovinos, pela diminuição dos níveis de GSH e atividade metabólica.

Palavras-chave: Pré-antral, Polifenol, Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), Viabilidade, TUNEL

## ABSTRACT

Resveratrol has emerged as a natural compound with immense therapeutic potential. It may act as an antioxidant against oxidative stress in different cells, however, resveratrol has never been used in preantral follicle culture. The aim of the present study was to evaluate the effect of resveratrol on viability, apoptosis and development of isolated ovine secondary follicles as well as intracellular glutathione (GSH) level and mitochondrial activity. After collection of the sheep ovaries, secondary follicles were isolated and cultured for 18 days in  $\alpha$ -MEM+ supplemented with BSA, insulin, transferrin, selenium, glutamine, hypoxanthine and ascorbic acid (control medium) or in control medium added by different concentrations of resveratrol (2; 10 or 30  $\mu$ M). The parameters analyzed were morphology, antrum formation, follicular diameter, growth rate, apoptosis, GSH levels and mitochondrial activity. All resveratrol groups significantly decreased the percentage of morphologically normal follicles at day 18 compared with the control group ( $\alpha$ -MEM+). Antrum formation was higher in follicles cultured in  $\alpha$ -MEM+ alone or added with 2  $\mu$ M resveratrol than those cultured in presence of 10  $\mu$ M resveratrol. In addition, follicles cultured with 30  $\mu$ M resveratrol showed a higher percentage of apoptotic oocytes when compared to follicles cultured in control medium. Oocytes from follicles cultured with 10 and 30  $\mu$ M resveratrol significantly decreased intracellular GSH levels compared with those cultured with 2  $\mu$ M resveratrol. Moreover, follicles cultured in  $\alpha$ -MEM+ (control) showed more active mitochondria than those cultured with 10 and 30  $\mu$ M resveratrol. In conclusion, this study showed that resveratrol, at high concentrations, decrease follicular viability and promote oocyte apoptosis after in vitro culture of ovine secondary follicles, by decreasing GSH levels and metabolic activity.

Keywords: Preantral, Polyphenol, Reactives oxygen species (ROS), Viability, TUNEL

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Revisão Bibliográfica

**Figura 1.** Esquema do ovário mamífero.

Adaptado de: <http://www.tarleton.edu/Departaments/anatomy/ovary.html>

**Figura 2.** Papel dos fatores de transcrição durante a oogênese.

Adaptado de JAGARLAMUDI; RAJKOVIC, (2012).

**Figura 3.** Desenvolvimento do folículo ovariano durante a vida fetal e adulta. Durante a vida fetal, a apoptose ocorre no oócito e, na vida adulta, ocorre nas células da granulosa. Adaptado de HUSSEIN, 2005.

**Figura 4.** Representação esquemática das principais vias moleculares que levam à apoptose. Adaptado de FAVALORO et al., 2012.

**Figura 5.** Estrutura química do (a) trans- e (b) cis-resveratrol.

Fonte: DELMAS et al., 2011.

**Figura 6.** Folículos pré-antrais marcados com etídio homodímero-1 (vermelho; A) e calceína- AM (verde; B). Fonte: SILVA et al., 2014.

**Figura 7.** Formação do composto fluorescente DCF por ERO (A) e óocitos caprinos maturados *in vitro* corados com diacetato diclorodihidrofluorosceína (H<sub>2</sub>DCFDA). Fontes: HELD, 2015; MUKHERJEE et al., 2014.

**Figura 8.** Oócitos caprinos corados com Cell Tracker blue (A) e células da granunola coradas com Mito tracker red. Fontes: MUKHERJEE et al., 2014; TANABE et al., 2015)

**Figura 9.** Embriões bovinos submetido à técnica de TUNEL. Os núcleos TUNEL-positivos foram corados em verde. Ponta de seta indica fragmentação de DNA. Fonte: MIRANDA et al., 2009.

## Capítulo 1

**Figura 1.** Folículos secundários morfologicamente normais no dia 0 (A); folículo antral, atrésico (C) e extruso após 6 dias de cultivo em 30  $\mu$ M resveratrol (D). O: oócito; CG: célula da granulosa; seta: cavidade antral. Barra de escala: 200  $\mu$ m.

**Figura 2.** Percentage de folículos morfologicamente normais cultivados em  $\alpha$ -MEM+ ou diferentes concentrações de Resveratrol (RSV 2,0; 10 ou 30  $\mu$ M). (a,b) Diferentes letras denotam diferenças significativas entre os períodos de cultivo no mesmo tratamento ( $P < 0,05$ ). (A, B) Diferentes letras denotam diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo dia ( $P < 0,05$ ). Folículos secundários morfologicamente normais no dia 0 (A); folículo antral, atrésico (C) e extruso após 6 dias de cultivo em 30  $\mu$ M resveratrol (D). O: oócito; CG: célula da granulosa; seta: cavidade antral. Barra de escala: 200  $\mu$ m.

**Figura 3.** Percentagem de formação de cavidade antral de folículos cultivados em  $\alpha$ -MEM+ sozinho ou suplementado com diferentes concentrações de Resveratrol (RSV 2; 10 ou 30  $\mu$ M). (a,b) Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os períodos de cultivos no mesmo tratamento ( $P < 0,05$ ). (A,B) Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo período ( $P < 0,05$ ).

**Figura 4.** Identificação de oócitos apoptóticos, através do TUNEL, após 18 dias de cultivo in vitro. (A) Oócitos normais do grupo controle e (B) oócitos TUNEL-positivos (células em verde) do grupo 30  $\mu$ M de resveratrol.

**Figura 5.** Percentagem (média  $\pm$  EPM) de oócitos TUNEL-positivos após 18 dias de cultivo em diferentes concentrações de resveratrol. (A,B ) Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0.05$ ).

**Figura 6.** Imagens fotomicrográficas epifluorescentes de oócitos ovinos cultivados. (a) Oócitos foram corados com CellTracker Blue (A-D) e MitoTracker red (E-H) para detectar os níveis de glutathiona (GSH) e atividade mitocondrial, respectivamente. Oócitos cultivados no grupo controle (A e E) ou com 2,0 (B e F), 10,0 (C e G) ou 30  $\mu$ M (D e H) de resveratrol. Barra de escala: 50  $\mu$ m (b) Efeito do tratamento resveratrol no meio de cultivo *in vitro* sob os níveis intracelulares de GSH e atividade mitocondrial em oócitos ovinos. Dentro de cada grupo (GSH e atividade mitocondrial) barras com diferentes letras (A-C) são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
$\alpha$ -MEM	Alpha minimal essential medium (Meio Essencial Mínimo alfa)
$\mu$ g	Micrograma(s)
$\mu$ m	Micrômetro(s)
$\mu$ M	Micromolar
ANOVA	Analysis of variance (Análise de variância)
BLIMP1	B-lymphocyte-induced maturation protein 1
BMP-15	Bone Morphogenetic Protein 15
BSA	Bovine serum albumin (Albumina sérica bovina)
CGP	Células germinativas primordiais
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
DBP	Di-n-butil-ftalato
DISC	Death Initiation Signalling Complex
DNA	Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucléico)
E2	17 $\beta$ -estradiol

e.p.	Erro padrão da média
ER	Receptor de estradiol
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
EthD-1	Etídio homodímero-1
et al.	et alii (e colaboradores)
FGFb	Basic Fibroblast Growth Factor
FITIC	Isotiocianato de fluoresceína
FIV	Fecundação in vitro
Foxo3a	Forkhead transcription factor (fator de transcrição Foxo forkhead)
GDF-9	Growth Differentiation Factor 9
GSH	Glutathiona
h	Horas
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
Kg	Quilograma
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LH	Luteinizing hormone (Hormônio Luteinizante)
MEM	Minimal Essential Medium (Meio Essencial Mínimo)
MEM-HEPES	Meio Essencial Mínimo adicionado de tampão HEPES
mg	Miligrama(s)

Min	Minuto(s)
MIV	Maturação in vitro
mL	Mililitro(s)
mM	Milimolar
Mm	Milímetro(s)
MOIFOPA	Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais
n	Número de amostras
ng	Nanograma(s)
P < 0,05	Probabilidade de erro menor do que 5%
PBS	Phosphate buffered saline (tampão fosfato-salino)
pH	potencial hidrogeniônico
PI3K	Phosphoinosite 3 kinase
POU5F1	Fator transcricional 1 domínio POU classe 5
RSV	Resveratrol
TBP2	TATA proteína de ligação 2
TNF	Tumor Necrosis Factor
TUNEL	Terminal deoxynucleotidil transferase-mediated dUTP nick endlabeling
UNIVASF	Universidade Federal do Vale do São Francisco
USA	United States of America (Estados Unidos da América)

ZFX Fator de transcrição dedo de zinco

ZP Zona pelúcida

# SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	17
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	19
2.1	Ovário Mamífero.....	19
2.2	Oogênese e foliculogênese .....	20
2.3.	População e Atresia Folicular.....	23
2.4.	Apoptose .....	25
2.5.	Biotécnica de MOIFOPA e suas Aplicações .....	27
2.5.1.	Cultivo In Vitro de Folículos Pré-Antrais (CIV) .....	28
2.5.2.	Importância da composição do meio de cultivo.....	30
2.6.	Resveratrol.....	31
2.6.1.	Atividades biológicas do resveratrol <i>in vivo</i> .....	32
2.6.2.	Atividades biológicas do resveratrol <i>in vitro</i> .....	33
2.6.2.1.	Células tumorais e renais.....	33
2.6.2.2.	Espermatozoides.....	34
2.6.2.3.	Células da granulosa e teca.....	35
2.6.2.4.	Oócitos e embriões.....	35
2.7.	Técnicas para detectar viabilidade folicular, metabolismo celular e apoptose .....	36
2.7.1	Microscopia de fluorescência.....	36
2.7.2	TUNEL.....	39
3.	JUSTIFICATIVA.....	40
4.	OBJETIVOS.....	41
4.1	Objetivo Geral .....	41

4.2 Objetivos Específicos.....	41
5. CAPÍTULO 1 .....	42
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXO.....	71

## 1. INTRODUÇÃO

A criação de ovinos no Brasil, em especial na região nordeste, tem sido desenvolvida de maneira crescente. Cada vez mais, os produtores têm visto nos ovinos uma excelente fonte de renda, através da venda dos animais e da produção de carne ou pele, atendendo, assim, o mercado consumidor. Diante disso, com o intuito de aumentar o potencial reprodutivo das ovelhas, torna-se prioritário o desenvolvimento de pesquisas que contribuam para uma melhor compreensão dos processos relacionados com a formação, crescimento e maturação dos oócitos inclusos em folículos ovarianos ovinos.

Neste contexto, a biotécnica de Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais (MOIFOPA), se destaca pela potencialidade de recuperar milhares de oócitos viáveis inclusos em folículos pré-antrais e, posteriormente, possibilitar seu desenvolvimento até a maturação, prevenindo o processo de atresia que ocorre largamente nos ovários (FIGUEREIDO et al., 2010). No entanto, os oócitos, quando retirados do seu ambiente natural perdem sua viabilidade quando submetidos ao cultivo in vitro . Desta forma, cuidados especiais devem ser tomados, como a adição de antioxidantes ao meio de cultivo. Alguns estudos têm avaliado o efeito da adição diferentes antioxidantes ao meio de cultivo (ácido alfa lipóico (ALA) : TABELI et al., 2012; melatonina: GANJI et al., 2013). Outra substância que parecer exercer efeito antioxidante é o resveratrol.

O resveratrol (3,5,4-trihydroxystilbene), um polifenol natural largamente encontrado em uvas e vinhos tintos, tem se tornando alvo de pesquisas devido às suas ações anti-inflamatória, anti-tumoral e, principalmente, antioxidante (LEIRO et al., 2004; BAUR ESINCLAIR, 2006; MORITA et al., 2012). O resveratrol já tem sido utilizado nos procedimentos de criopreservação de sêmen humano para evitar ou minimizar os danos causados ao DNA e, conseqüentemente, preservar a integridade dos espermatozoides (BRANCO et al., 2010; GARCEZ et al., 2010). Alguns autores já observaram que meio contendo resveratrol favorece uma maior formação de blastocistos e menor expressão de genes pró-apoptóticos (caspase-3 e bax) após maturação in vitro (MIV) de oócitos suínos (KWAK et al., 2012), bem como menores taxas de apoptose, através da redução da atividade da caspase-3, após cultivo in

vitro de células da granulosa de ratas (ORTEGA et al., 2012). Contudo, o resveratrol pode desempenhar papéis distintos dependendo do tipo celular. Wong et al. (2010) demonstraram que o resveratrol exerce ações antiproliferativas e pró-apoptóticas após cultivo de células da teca de ratas. Entretanto, o efeito do resveratrol sobre o desenvolvimento in vitro de folículos secundários ovinos é desconhecido.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

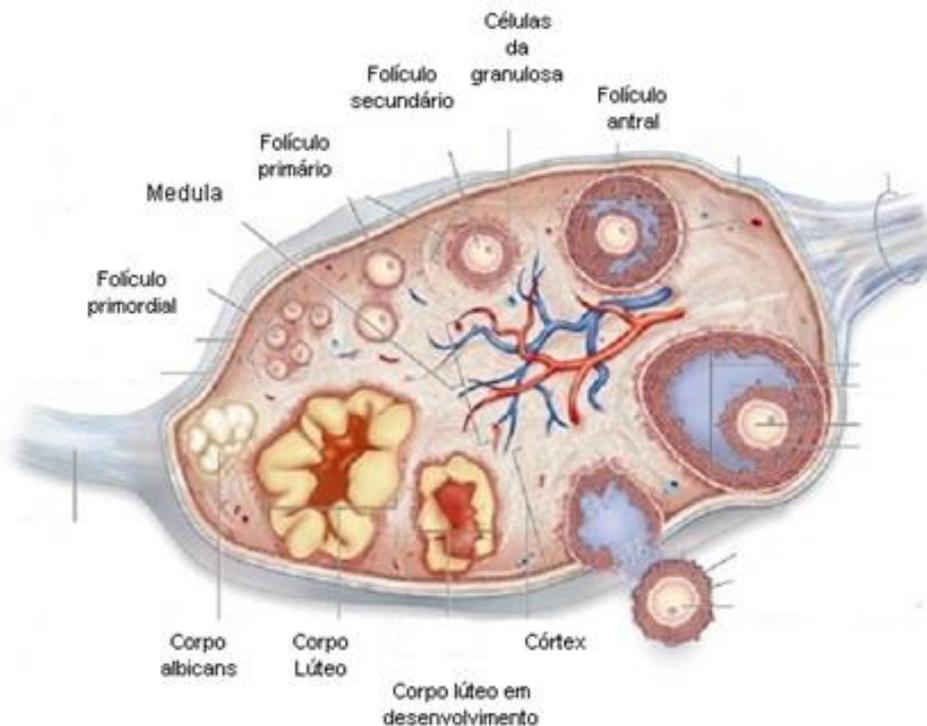
### 2.1 Ovário mamífero

O ovário mamífero é constituído por muitos tipos de células diferenciadas como por exemplo oócitos, células da granulosa, da teca, luteais e do estroma ovariano (Figura 1). Todas estas células trabalham em conjunto para promover um ambiente ideal para o desempenho de suas funções endócrina (síntese e secreção de hormônios e fatores de crescimento) e gametogênica (liberação de oócitos maduros aptos à fecundação) (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006; KNIGHT; GLISTER, 2006).

Este órgão é dividido em duas regiões distintas: a cortical, de localização mais externa, onde podem ser observados folículos ovarianos em diversos estágios de desenvolvimento, além de corpos lúteos, e a região medular, de localização mais interna, que é constituída por tecido conjuntivo, ricamente vascularizado, fibroblastos e fibras colágenas (SANTOS et al., 2006).

**Figura 1.** Esquema do ovário mamífero.

Adaptado de: <http://www.tarleton.edu/Departaments/anatomy/ovary.html>



Após o nascimento, nota-se no ovário ovino, um pool de folículos em fase de repouso ou quiescentes, que constitui a reserva ovariana. Essa reserva inclui os folículos classificados como primordiais, que representam a grande maioria dos folículos presentes no ovário (95%). Em todas as espécies de mamíferos, estes folículos deixam o estoque de folículos quiescentes em um fluxo contínuo, seja por atresia ou por entrada para a fase de crescimento (GOUGEON, 2010).

## 2.2 Oogênese e foliculogênese

A oogênese começa durante a embriogênese inicial com alguns genes de efeito materno (genes que são herdados do ovo e afetam os eventos pós-fertilização), que iniciam a transcrição durante os estágios iniciais da foliculogênese (JAGARLAMUDI e RAJKOVIC 2012). No período embrionário, as células germinativas primordiais (CGPs) migram do saco vitelínico até os primórdios gonadais, onde as gônadas irão se desenvolver. No início da fase ativa da sua migração, as CGPs modificam as suas características morfológicas e bioquímicas, adquirindo uma forma alongada (PALMA et al., 2012). Estas células interagem com o meio ambiente ao redor utilizando interações receptor/ligante e ligações especializadas para facilitar a sua migração até a região das gônadas (JAGARLAMUDI e RAJKOVIC 2012).

A regulação do desenvolvimento, migração e proliferação das CGPs é importante para evitar a perda prematura de células germinativas em humanos (JAGARLAMUDI e RAJKOVIC 2012). Sabe-se que algumas moléculas e reguladores governam o desenvolvimento e proliferação das CGPs. Os genes que são expressos nas células germinativas, assim como nas células somáticas gonadais são importantes para a formação e diferenciação gonadal. Vários reguladores de transcrição são conhecidos por interferir inicialmente na formação das gônadas, como por exemplo o LHX9 (BIRK et al., 2000), a proteína de maturação 1 induzida por linfócitos B (BLIMP1, também conhecida como PRDM1: OHINATA et al., 2009), o fator transcricional 1, domínio POU, classe 5, (POU5F1) (PESCE e SCHOLER, 2000) e o fator de transcrição dedo de zinco (Zfx)(LUOH et al., 1997).

Após a migração das CGPs para os primórdios gonadais, estas células se proliferam e se transformam em oogônias. Em seguida, as oogônias entram na primeira divisão meiótica e recebem a denominação de oócitos primários. Estes se caracterizam por apresentar um núcleo em fase de diplóteno da prófase I, conhecido como vesícula germinativa (FIGUEIREDO et al., 2008). Nessa fase, os oócitos primários são envolvidos por células achatadas denominadas de células da pré-granulosa, originárias do mesoderma (JUNQUEIRA e CARNEIRO 2004), dando origem aos folículos primordiais. Uma massiva perda de oócitos ocorre durante a formação dos folículos primordiais, porém os mecanismos dessa perda não são bem conhecidos (JAGARLAMUDI e RAJKOVIC 2012). Uma vez formados, os folículos primordiais podem ser perdidos a partir da reserva do ovário como consequência da exposição a fatores de estresse exógenos e endógenos, tais como quimioterapia, radioterapia e tóxicos ambientais (KERR et al. 2012a, SOBINOFF et al. 2013, SIVAKUMAR et al., 2014). Estes agentes são conhecidos por ativar as respostas apoptóticas dentro do próprio oócito do folículo primordial, bem como nas células da granulosa de folículos em crescimento (SUH et al., 2006).

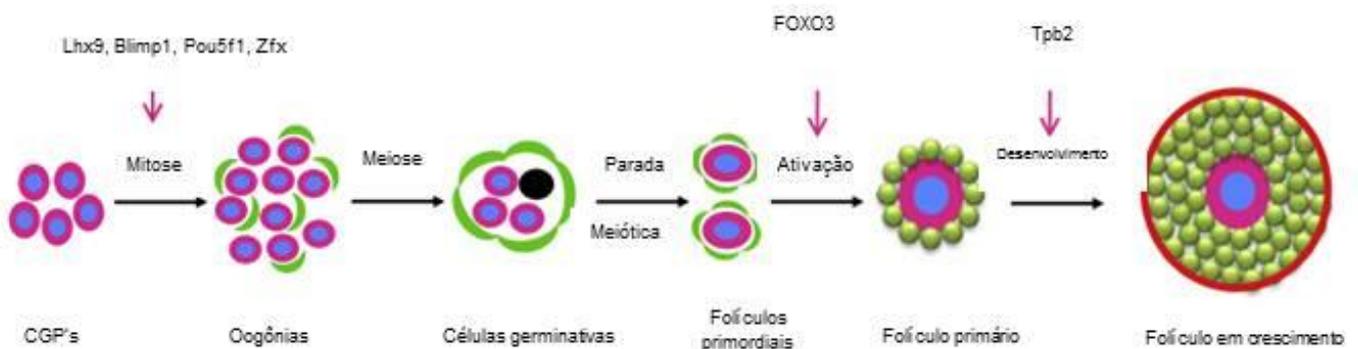
Os folículos primordiais são definidos como um oócito circundado por uma camada de 4-8 células da pré-granulosa, de morfologia pavimentosa (FAIR, 2003). Assim como a migração e a proliferação das CGPs são coordenadas por alguns fatores transcricionais, a passagem do estágio de folículo primordial para primário também requer a expressão de alguns fatores. Sabe-se que a via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K-Akt) está presente na ativação de folículos primordiais (JOHN et al., 2008; REDDY et al., 2008) via Fator de transcrição forkhead (FOXO3), sendo este o efetor primário da ativação do folículo primordial. O FOXO 3 atua na ausência do seu antagonista, a Fosfatase e homólogo de tensina (PTEN) (JOHN et al, 2008). Os folículos primordiais passam para o estágio de folículo primário sob influência de diversos fatores, como fator inibitório da leucemia (LIF), fator de crescimento fibroblástico básico (FGFb) (KEZELE et al., 2005; NILSSON et al., 2006; NILSSON e SKINNER, 2004; SCHINDLER et al., 2010; SKINNER, 2005), Kit ligante (KL) e fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) (ESMAIELZADEH et al, 2013)

O folículo primário é caracterizado pela presença de uma camada de células da granulosa de morfologia cuboide, ao redor do oócito (BRAW-TAL e YOSSEFI, 1997). A transição de folículo primário para folículo secundário é impulsionado por fatores produzidos pelo oócito, células da granulosa e células da teca (KOL et al., 1995) e

essa transição é caracterizada pela multiplicação das células da granulosa, levando à formação de várias camadas destas células ao redor do oócito (PAN et al., 2012). Além disso, tal transição requer a expressão e ação de proteína de ligação à sequência TATA (TBP2), um fator de transcrição específico do oócito, expresso ao longo da folliculogênese. Ovários de ratas deficientes em TBP2 têm um reduzido número de folículos secundários e uma expressão alterada de transcrições específicas de oócitos envolvidos na folliculogênese inicial. Por exemplo, os níveis de Fator de Crescimento e Diferenciação 9 (GDF-9), Proteína Morfogênica Óssea (BMP-15) e o gene Zona Pelúcida 3 (ZP3) estão diminuídos, ao passo que os níveis de Oct4 e Nobox estão aumentados (OTSUKA et al., 2000). Assim, um papel potencial de TBP2 na regulação do controle transcricional da oogênese foi sugerido (SÁNCHEZ e SMITZ, 2012) (Fig. 2).

Estudos demonstram que o GDF-9 promove o crescimento de folículos primários e a proliferação de células da teca de ratas (NILSSON e SKINNER, 2002), estimula a manutenção da viabilidade folicular e a proliferação de células da granulosa de humanos (HREISSON et al., 2002). A BMP-15 promove a proliferação das células da granulosa e estimula o desenvolvimento de folículos primordiais e primários em roedores (FORTUNE, 2003; OTSUKA et al., 2000; NILSSON e SKINNER, 2002) e ovinos (McNatty et al, 2003), ou seja, é um importante regulador da mitose das células da granulosa e do desenvolvimento folicular inicial (FORTUNE, 2003; OTSUKA et al., 2000; NILSSON e SKINNER, 2002).

**Figura 2.** Papel dos fatores de transcrição durante a oogênese. Adaptado de Jagarlamudi e Rajkovic, (2012).



Sob a influência de gonadotrofinas (JAGARLAMUDI e RAJKOVIC, 2012) e de fatores de crescimento, como por exemplo, o Fator de crescimento Semelhante a Insulina (IGF-1; SILVA et al., 2009), os folículos secundários se transformam em folículos antrais (JAGARLAMUDI e RAJKOVIC, 2012), caracterizados por uma cavidade repleta de líquido folicular entre as camadas de células granulosa, denominada antro (FORTUNE, 2003). Além disso, o seu diâmetro aumenta acentuadamente devido ao crescimento do oócito, multiplicação das células da granulosa, da teca e aumento do fluido antral (DRIANCOURT et al., 1991). Tal fluido pode servir como uma importante fonte de substâncias reguladoras derivadas do sangue ou secreções das células foliculares, isto é, gonadotrofinas, esteróides, fatores de crescimento, enzimas, proteoglicanos (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). Durante todo o crescimento folicular, o volume oocitário aumenta significativamente. Porém, o oócito continua com o núcleo em estágio de prófase I e só retoma a meiose após o pico pré-ovulatório de LH. Em seguida, o oócito permanece no estágio de metáfase II até o momento da fecundação (PAN et al., 2012).

### **2.3 População ovariana e atresia folicular**

Os folículos pré-antrais representam cerca de 90 a 95% de toda população folicular e, desta forma, armazenam a grande maioria dos oócitos presentes em ovários mamíferos. No tocante aos ruminantes domésticos, a formação dos folículos ovarianos e, conseqüentemente, a dos oócitos neles contidos, iniciam-se no período pré-natal (FIGUEIREDO et al., 2008). Entretanto, recentemente, alguns pesquisadores têm demonstrado a possibilidade da formação, após o nascimento, de novas células germinativas e de folículos na mulher (BUKOVSKI et al., 2004) e em camundongos fêmeas adultos (JOHNSON et al., 2004). Essas descobertas indicam um novo caminho a ser pesquisado na área da biologia reprodutiva de fêmeas mamíferas. No entanto, muitos trabalhos ainda são necessários para esclarecer se as células germinativas primordiais poderão ser capazes de se diferenciar espontaneamente em folículos *in vivo*, bem como também

esclarecer quais mecanismos promoveriam a neofoliculogênese em pacientes inférteis (PESSOA, 2013).

A população folicular difere entre as espécies, sendo de 160.000 na ovelha (DRIANCOURT, 1991). Apesar desse grande número de folículos presentes no ovário, a grande maioria (99,9%) não chega até à ovulação, mas ao contrário, é eliminada por meio de um processo conhecido por atresia ou morte folicular (ARAUJO et al, 2014). A atresia pode ocorrer por duas vias: apoptótica e/ou degenerativa (necrose).

A apoptose é uma forma de morte celular determinada geneticamente e biologicamente funcional (HUSSEIN, 2005). As características morfológicas da apoptose são a eliminação de uma única célula, perturbações do citoesqueleto, retração celular, vacúolos na membrana, condensação nuclear, formação de corpos apoptóticos e a fagocitose pelas células vizinhas. A permeabilidade celular permanece inalterada, e as organelas mantêm sua integridade morfofuncional (ABIR et al., 2002).

A necrose é consequência de lesões provocadas por fatores ambientais-patológicos e está associada a uma série de alterações celulares, que se iniciam com a alteração da permeabilidade da membrana celular, seguido de ruptura das estruturas citoplasmáticas e, em seguida, degeneração nuclear. A morte de grupos de células, perda da integridade da membrana celular, turgidez e lise, vazamento lisossomal e agregação mal definida da cromatina identificam a necrose (ABIR et al., 2002).

No estágio inicial da atresia, as células foliculares apresentam características morfológicas típicas de apoptose, tais como a condensação da cromatina nuclear precoce em massas densas, na periferia nuclear. Além disso, os corpos apoptóticos são observados no interior das células adjacentes. Diante disso, é sugerido a participação da apoptose no início da atresia. No entanto, as alterações morfológicas acentuadas no final da atresia parecem estar envolvidas com a necrose. Além disso, as células foliculares também apresentam alterações mais drásticas, incluindo dilatações de membrana nuclear, ausência de cristas nas mitocôndrias e presença de vacúolos citoplasmáticos (AGUIRRE et al., 2013). A seguir, serão apresentados mais detalhes sobre a apoptose.

## 2.4 Apoptose

Antes do nascimento, a grande maioria dos oócitos são perdidos no ovário fetal. Durante a vida fetal, a apoptose está localizada nos oócitos (HUSSEIN, 2005). Durante a idade adulta, a apoptose é detectada em células da granulosa de folículos secundários e antrais (HUSSEIN, 2005). Isso mostra que a apoptose pode ocorrer em várias fases do desenvolvimento folicular e oocitário.

Os mecanismos de decisão entre vida e morte celular envolvem um diálogo entre moléculas pró-apoptóticas e pró-sobrevivência (HUSSEIN, 2005). Além disso, dois mecanismos gerais participam da apoptose: um é desencadeado pela ligação de moléculas de morte celular com os receptores da superfície celular (eventos de morte mediada pelo receptor), caracterizando a via extrínseca da apoptose. A outra via é iniciada por sinais que surgem no interior da célula (eventos mediados por mitocôndrias), caracterizando a via intrínseca da apoptose. (HUSSEIN et al., 2003a) (Fig 3).

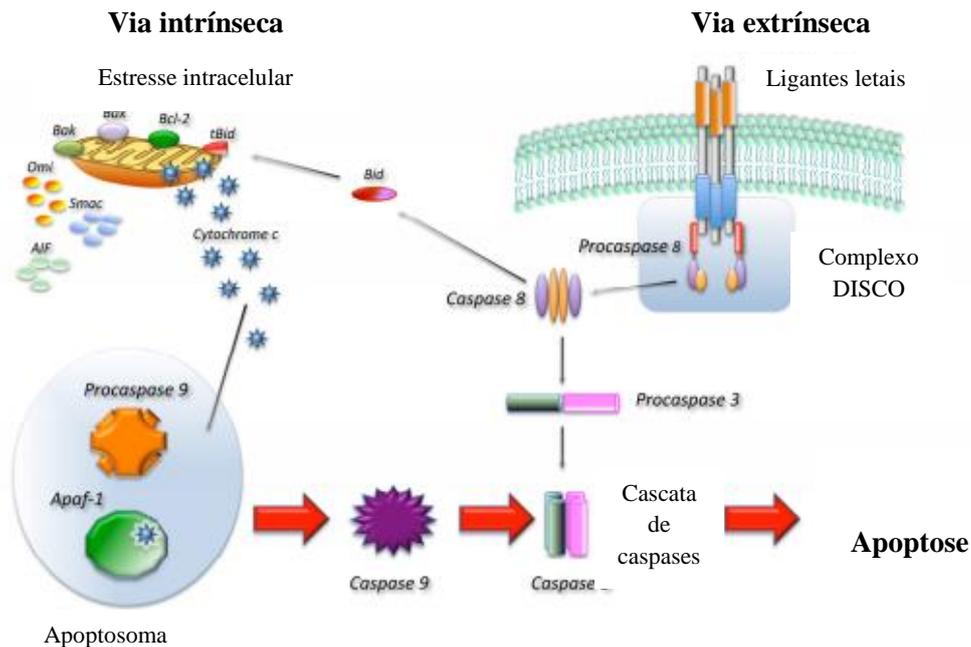
No que diz respeito à via intrínseca, diversos fatores de estresse podem resultar na sua ativação, como por exemplo, espécies reativas de oxigênio (EROs), ausência de fatores de crescimento e hormônios. Em todos os casos, estas várias formas de estresse convergem para a mitocôndria e determinam a permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP), esta por sua vez resulta na dissipação do potencial da membrana mitocondrial e, por conseguinte, na cessação da produção de ATP, assim como liberação de uma série de proteínas que contribuem para a ativação da caspase. A capacidade de formação de poros de algumas das proteínas da família Bcl-2 na membrana mitocondrial, tem sido proposta para explicar como os diferentes sinais convergem na mitocôndria, resultando em MOMP (GREEN e KROEMER, 2004; YIVGI-OHANA et al, 2011). As proteínas da família Bcl-2, são reguladores essenciais deste tipo de apoptose e são todas caracterizadas pela presença de pelo menos uma proteína Bcl-2 de domínio Homólogo (BH). De um ponto de vista funcional, os membros que podem ser classificados em anti-apoptóticos contêm três ou quatro domínios BH (tais como Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1), e os membros pró-apoptóticos com dois ou três domínios BH (tais como Bax, Bak, Bcl-xs, Bok) ou com apenas um (como Bad, Bik, Bid, Bim, Noxa, Puma). Os membros pró-apoptóticos da família mediam a apoptose por perturbar a integridade

da membrana, induzindo a formação de poros. Os diferentes sinais apoptóticos são detectados por proteína BH3-apeenas que são induzidas ou ativadas e migram para as mitocôndrias onde se ligam aos membros pró-apoptóticos, promovendo, assim, a sua agregação (CHIPUK e GREEN, 2008).

Em qualquer caso, uma vez ocorrendo o MOMP, um certo número de proteínas são liberadas a partir da mitocôndria, estas incluem o Citocromo C, fator indutor da apoptose (AIF), a endonuclease G (endo G), proteína de ligação direta IAP com baixo PI (DIABLO, também conhecido como SMAC) e outros. Uma vez CYTC é liberado, liga-se a Apaf-1 induzindo a formação de um complexo grande, conhecido como o apoptossomo, que recruta a caspase-9. No apoptossomo, a caspase-9 é ativada e clivada e irá ativar moléculas adicionais, como a caspase 3. Devido à sua letalidade, o sistema está sujeito a um certo número de controles, como por exemplo, uma classe de proteínas conhecida como inibidores de apoptose (IAP), que se ligam e inativam as caspases. Após a MOMP, a mitocôndria liberta também proteínas tais como DIABLO / SMAC que se ligam a IAPS, removendo a sua inibição de apoptose e permitindo que ocorra apoptose (FAVALORO et al., 2012)

Com relação à via extrínseca, esta é iniciada por hormônios extracelulares ou agonistas que pertencem à superfamília do fator de necrose tumoral (TNF), incluindo o  $TNF\alpha$ , Fas / CD95 ligante, Apo2 e TRAIL. Estes agonistas reconhecem e ativam seus receptores correspondentes, os membros da família de receptores de TNF / NGF, tais como TNFR1, Fas / CD95, e Apo2. Em seguida, através de uma série de interações proteína-proteína, envolvendo domínios, que incluem o domínio de morte e o domínio efetor de morte, os receptores irão recrutar proteínas adaptadoras específicas para formar um complexo chamado complexo de sinalização (DISCO) indutor de morte. Este complexo recruta e ativa as caspases iniciadoras (caspase-8), que ativam as caspases executoras, tais como a caspase-3 e caspase-7 (JIANG e WANG, 2004), responsáveis pela clivagem de proteínas essenciais, conduzindo à morte celular (HUTT, 2015). Hipóteses de causas subjacentes a esta perda apoptótica incluem: (i) 'controle de qualidade' para eliminar anomalias meióticas; (ii) um déficit de fatores de sobrevivência; e (iii) um "auto-sacrifício" (Hussein, 2005).

**Figura. 3** Representação esquemática das principais vias moleculares que levam à apoptose (FAVALORO et al., 2012).



Diante disso, visando evitar a grande perda folicular que ocorre naturalmente *in vivo* pela atresia, nas últimas décadas, vem sendo desenvolvida a biotécnica de MOIFOPA.

## 2.5. Biotécnica de MOIFOPA e suas Aplicações

A utilização e o desenvolvimento de biotécnicas da reprodução animal são condições indispensáveis para o aumento da eficiência produtiva dos rebanhos. Neste sentido, especialmente no tocante a ruminantes domésticos, biotécnicas como a inseminação artificial, a fecundação *in vitro* (FIV) e a transferência de embriões vêm sendo utilizadas com sucesso. Outras biotécnicas terão sua aplicabilidade prática em larga escala no futuro. Nesse grupo, pode-se incluir a clonagem e a manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA) (FIGUEIREDO et al, 2009). A importância da biotécnica de MOIFOPA deve-se ao fato de que 90% dos oócitos presentes nos ovários estão armazenados nos folículos

pré-antrais, ou seja, em folículos destituídos de antro. Além disso, a morte folicular por atresia ocorre predominantemente na fase antral (FIGUEIREDO et al, 2009).

Para a maximização do potencial reprodutivo, especialmente de fêmeas domésticas, é importante estudar a foliculogênese a fim de se compreender os mecanismos e fatores envolvidos nesse evento. Desta forma, a MOIFOPA visa o isolamento ou resgate de folículos pré-antrais a partir de ovários, conservação dos folículos por curto (resfriamento) ou longo (criopreservação) período e cultivo folicular *in vitro* (FIGUEIREDO et al, 2008). Neste sentido, folículos pré-antrais eficientemente isolados a partir de ovários, são uma grande fonte de oócitos (material genético) que podem alcançar a competência meiótica *in vitro*. Além disso, os oócitos imaturos de folículos pré-antrais podem ser utilizados em outras tecnologias de reprodução assistida, como a maturação *in vitro* (MIV) e produção de embriões, transgenia, e conservação de espécies ameaçadas de extinção (ARAUJO et al, 2014).

No entanto, os fatores e mecanismos responsáveis pelo controle da foliculogênese inicial ainda são pouco conhecidos e representam uma das principais questões relacionadas com a biologia do ovário (ARAUJO et al, 2014).

### **2.5.1 Cultivo *In Vitro* de Folículos Pré-Antrais (CIV)**

O cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais é uma ferramenta importante para estudar a foliculogênese, pois possibilita a avaliação de diferentes substâncias (gonadotrofinas, fatores intra-ovarianos) (FIGUEIREDO et al., 2007). Basicamente, existem duas maneiras de cultivar os folículos pré-antrais: 1) inclusos em fragmentos de tecido ovariano (fatias ou tiras), também chamado de cultivo *in situ*; ou 2) utilizando folículos isolados. Os folículos isolados podem ser cultivados em um sistema de duas dimensões (2D). Nesse sistema, o folículo é colocado na superfície, que pode ser plástico ou matriz extracelular (por exemplo, gel de colágeno, matrigel, etc). Além do sistema 2D, os folículos podem ser cultivados em um sistema tridimensional (3D), inclusos em uma matriz extracelular (ARAUJO et al., 2014).

No tocante ao cultivo de folículos isolados em sistema 2D, este já foi utilizado em diferentes espécies (suína: LIU et al., 2003; CECCONI et al., 2004; caprina: ARAÚJO et al., 2011; BARROS et al., 2013, ovina: SANTOS et al., 2014; BARBERINO et al., 2015; bovina: ROSSETO et al., 2013; ARAÚJO et al., 2014). Atualmente, a principal utilização do cultivo de folículos isolados é para promover o crescimento e desenvolvimento dos oócitos imaturos e permitir a compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do oócito, na diferenciação de células da granulosa, e na regulação de fatores autócrinos / parácrinos que controlam os estágios iniciais de foliculogênese (THOMAS, WALTER e TELFFER, 2003).

Neste sentido, um sistema de cultivo eficiente precisa manter a morfologia folicular, a sobrevivência, a proliferação, a esteroidogênese e a expressão gênica. Adicionalmente, fatores, tais como a idade (adultos ou imaturos) dos animais, categoria folicular (folículos pré-antrais iniciais ou tardios, ou folículos antrais) a ser utilizada, e o sistema de cultivo in vitro (duas ou três dimensões) devem ser considerados fontes muito importantes de variação de dados. Este fato tem estimulado um grande interesse no desenvolvimento de um sistema de cultivo capaz de manter o crescimento folicular e evitar a perda de folículos (ARAÚJO et al., 2014). Além disso, uma das principais causas de morte folicular, durante o cultivo, é a produção em excesso de EROs.

As EROs são formadas como subproduto do metabolismo aeróbio e, quando acumuladas, podem reagir com moléculas biológicas (BARBOSA et al., 2014) e funcionar como sinalizadoras e indutoras de processos que causam injúrias às células, como a peroxidação dos lipídios das membranas, danos ao DNA e morte celular por apoptose ou necrose. Os níveis intracelulares das EROs podem determinar se a célula continua viva ou morre por apoptose ou necrose (LIMA-VERDE et al., 2007).

A instalação do estresse oxidativo se dá por meio de um desequilíbrio entre os fatores pró-oxidantes e antioxidantes (BARBOSA et al., 2010). Em folículos, a falha dos mecanismos de defesa antioxidantes para neutralizar o estresse oxidativo permite que as EROs alterem o estado redox celular (redução-oxidação), com a diminuição da capacidade antioxidante total (OYAWOYE et al., 2003). Para reverter o quadro de estresse oxidativo, é preciso reduzir a produção de EROs ou aumentar a quantidade de antioxidantes disponíveis (ANDRADE et al., 2010). Neste sentido, a

composição do meio de cultivo utilizado para promover o desenvolvimento folicular é um fator essencial para o sucesso do cultivo in vitro.

### **2.5.2 Importância da composição do meio de cultivo**

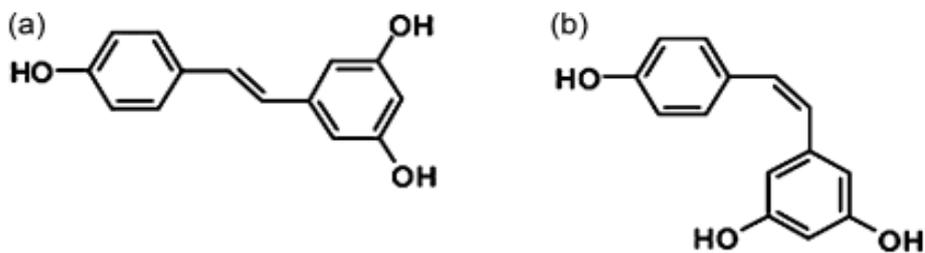
O meio de cultivo é um dos principais fatores que influencia o desenvolvimento folicular in vitro. Diversos meios já foram testados, bem como a adição de diferentes substâncias. O meio de cultivo deve garantir o fornecimento adequado de eletrólitos, antioxidantes, aminoácidos, substratos energéticos e vitaminas (PICTON et al., 2008). Com relação aos antioxidantes, estes são adicionadas ao meio na tentativa de contrapor o aumento indiscriminado de EROs produzidas durante o cultivo in vitro (SILVA et al., 2011). No entanto, é necessário cautela quanto à adição de antioxidantes ao meio de cultivo, uma vez que dependendo da concentração e da presença de outras substâncias antioxidantes no meio de cultivo, pode-se observar um efeito contrário. Ou seja, ao invés de proteger às células contra as EROs produzidas durante o metabolismo celular, as substâncias antioxidantes poderão atuar como pró-oxidantes, favorecendo maior produção de EROs, ou ainda, podem se ligar a receptores celulares, levando à morte da célula.

Várias substâncias antioxidantes foram testadas no cultivo in vitro de folículos pré-antrais ovinos isolados, como por exemplo, ácido ascórbico (ROSSETO et al, 2009; ANDRADE et al., 2012) e ácido alfa lipóico (TABELI et al., 2012). Outra substância que parece exercer função antioxidante na reprodução é o resveratrol.

## 2.6. Resveratrol

O resveratrol, termo comum para 3,5,4 V-hidroxistilbeno, é um polifenol pertencente à classe dos estilbenos e existe em ambas as formas isoméricas cis e trans (Fig. 4), esta última, a mais comumente encontrada em plantas (DELMAS et al., 2011)

**Figura 4.** Estrutura química do (a) trans- e (b) cis-resveratrol (DELMAS et al, 2011).



O resveratrol foi caracterizado como um fitoestrógeno com base na sua capacidade de competir com  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) pela ligação e modulação da atividade de receptor alfa do  $E_2$  (ER $\alpha$ ) (GEHM et al., 1997). Além disso, Bowers et al. (2000) mostraram que o resveratrol além de se ligar ao ER $\alpha$ , liga-se também ao ER $\beta$  com uma afinidade, menor que o  $E_2$ . Estes mesmos autores concluíram que o resveratrol ocupa ambos os receptores pela ligação de sequências particulares chamadas de elementos de resposta de  $E_2$  (EREs) de uma maneira dependente da concentração. Além disso, o resveratrol exerce atividade antagonista ao  $E_2$  a partir de certos EREs. Lin et al., (2006) descreveram que o resveratrol também pode se ligar à integrinas, glicoproteínas estruturais da membrana plasmática.

Alguns estudos têm mostrado que o resveratrol é efetivo para reduzir os riscos de aterosclerose, além de possuir atividade anti-tumoral, anti-inflamatória (SUBBARAMAIAH et al., 1998) e antioxidante (MORITA et al., 2012).

### 2.6.1. Atividades biológicas do resveratrol in vivo

Para avaliar os efeitos do resveratrol in vivo, SIMSEK et al. (2012) administraram diferentes doses (10 ou 100 mg/Kg) de resveratrol em ratas e, após 24 h, submeteram os animais à radiação. Os autores observaram que as ratas tratadas com resveratrol apresentavam significativamente mais folículos ovarianos, além de maior expressão da enzima glutathiona peroxidase do que os animais do grupo controle (sem resveratrol). Dessa forma, eles sugeriram que o resveratrol é eficiente em reduzir a perda folicular induzida pela radiação. Outro experimento in vivo demonstrou que a administração de resveratrol inibe a ativação folicular (transição de folículos primordiais para primários) em ratas, o que evitaria a falha ovariana prematura, além de reduzir as taxas de apoptose (KONG et al., 2011). Resultados similares foram observados por CHEN et al., (2010), em que o resveratrol aumentou a reserva de folículos ovarianos de ratas e promoveu uma redução na atresia. Liu et al., (2013) demonstraram que o resveratrol possui um efeito protetor sobre a fertilidade de camundongos fêmeas com idade avançada, aumentando o número de folículos viáveis, bem como a quantidade e qualidade dos oócitos.

Ginkel et al., (2007) estudando o efeito inibitório do resveratrol sobre o crescimento tumoral humano, observaram que os camundongos xenotransplantados com linhagens de células de neuroblastoma humanas (NGP e SK-N-AS), tratados por via oral com o resveratrol, tiveram diminuição do crescimento tumoral após 5 semanas de tratamento, quando comparados aos não tratados. Neste mesmo estudo, após aplicação peritumoral de 5 injeções de resveratrol, foi possível observar uma diminuição do tamanho do tumor, quando comparado ao grupo não tratado. Além disso, observou-se que o resveratrol inibiu o crescimento celular, uma vez que houve um aumento da porcentagem de células de neuroblastoma (SK-N-AS) na fase  $G_0$ - $G_1$  e S do ciclo celular.

## **2.6.2 Atividades biológicas do resveratrol *in vitro***

### **2.6.2.1 Células tumorais e renais**

O resveratrol foi utilizado, *in vitro*, em vários tipos de células com a finalidade de parar a proliferação celular, na sua maior parte numa forma irreversível, levando à apoptose. Este efeito tem sido atribuído à capacidade do resveratrol em modular a atividade de muitos mediadores chave do ciclo celular e da sobrevivência (Signorelli e Ghidoni, 2005). Mitchell et al., (1999) observaram que células do câncer de próstata tratadas com resveratrol sofreram uma diminuição em número, indicando redução do crescimento celular. Além disso, o resveratrol promoveu a inibição do crescimento de diversas linhagens de células tumorais humanas (Seg-1, HCE7, SW480, MCF7, e HL60 (JOE et al., 2002; HL60 CLÉMENT et al., 1996), bem como, induziu a apoptose dessas células.

O resveratrol pode induzir a apoptose em células de glioma U251 humanos tanto dose, quanto tempo-dependente. A apoptose induzida pelo resveratrol requer a ativação de caspase-3 e envolve o aumento da regulação da expressão de Bax, aumento da liberação de citocromo c e ativação da caspase-9. A relação temporal entre a indução de alterações da expressão de genes relacionados com a apoptose e a ativação de caspases indica que a via de sinalização intrínseca pode estar envolvida no processo de morte celular por apoptose induzida pelo resveratrol. Os resultados também mostram que o resveratrol inibe a proliferação celular e promove a indução da parada do crescimento nas fases G0/G1 através da supressão da expressão de ciclina D1, que pode contribuir para o processo de morte celular por apoptose (JIANG et al., 2005).

Com relação às células renais, o pré-tratamento com resveratrol protegeu o córtex renal de ratos contra a citotoxicidade da cisplatina, através da diminuição dos níveis de EROs e prevenção da peroxidação lipídica e estresse oxidativo (VALENTOVIC et al., 2014).

### 2.6.2.2 Espermatozoides

O resveratrol tem sido utilizado nos procedimentos de criopreservação de sêmen humano para evitar ou minimizar os danos causados ao DNA e, conseqüentemente, preservar a integridade dos espermatozoides (BRANCO et al., 2010; GARCEZ et al., 2010). Após avaliar o efeito protetor do resveratrol sobre o estresse crônico testicular causado por imobilização, Bitgul et al. (2013) observaram que os grupos tratados com resveratrol apresentavam forma e diâmetro dos túbulos seminíferos semelhantes ao grupo controle. Além disso, apresentaram menor número de células TUNEL e caspase-3 positivas, quando comparados ao grupo submetido ao estresse testicular. Neste mesmo estudo, foi possível observar que o grupo tratado com alta dose de resveratrol apresentou alto nível de testosterona sérica quando comparado ao grupo com estresse.

Ünal et al., (2013) concluíram que o resveratrol protege contra a apoptose de células espermáticas de ratos submetidos ao poluente Di-n-butil-ftalato (DBP), bem como manteve a estrutura do epitélio seminífero e espermatogênese. Além disso, foi observado que após aplicação de resveratrol, houve uma expressão do c-kit, um marcador de proliferação, migração e diferenciação celular, nos testículos de ratos tratados com DBP. Além disso, pós e pré-tratamento com resveratrol promoveu aumento no peso do testículo e epidídimo, diminuição de anormalidades dos espermatozoides e melhora da mobilidade espermática e do número de espermatozoides vivos, em comparação com ratos tratados com cipermetrina, um inseticida comumente utilizado (SHARMA et al., 2015). Após torção testicular em ratos, Ylung et al., (2014) observaram que o resveratrol promoveu um efeito positivo no equilíbrio oxidante/antioxidante, redução da lesão histopatológica e prevenção da apoptose.

### **2.6.2.3 Células da granulosa e teca**

Um estudo recente demonstrou que, após cultivo de células da granulosa de ratas, baixas concentrações de resveratrol estimularam a incorporação de timidina triciada, o que é indicativo de proliferação celular, e altas concentrações inibiram esta incorporação (ORTEGA et al., 2012). Este mesmo estudo mostrou ainda que o resveratrol reduziu a apoptose, através da redução da expressão da caspase-3 e possibilitou a manutenção da morfologia celular. Contudo, efeitos contrários foram encontrados quando células da teca de ratas foram cultivadas in vitro (WONG et al., 2010). Neste estudo, o resveratrol exerceu um efeito antiproliferativo e próapoptótico através da ativação das caspases-3 e 7, além de provocar mudanças na morfologia dessas células.

### **2.6.2.4 Oócitos e embriões**

Estudos com oócitos suínos demonstraram que a presença de diferentes concentrações de resveratrol (0,5; 2,0 e 10,0  $\mu\text{M}$ ) na maturação in vitro (MIV) promoveram uma redução significativa nos níveis de EROs utilizando-se 2,0  $\mu\text{M}$  de resveratrol, comparado aos demais tratamentos (KWAK et al., 2012). Estes autores também relataram maior formação de blastocistos e menor expressão de genes relacionados com apoptose (caspase-3 e bax), comparados ao controle. Além disso, a suplementação do meio de MIV com resveratrol nas concentrações de 0,25 ou 0,5  $\mu\text{M}$  melhoram o desenvolvimento de embriões partenogênicos e clonados em suínos, bem como diminui a expressão de genes pró-apoptóticos em células do cumulus, oócitos maduros e blastocistos (MUKHERJEE et al., 2014)

Outro estudo demonstrou que os blastocistos suínos produzidos in vitro possuíam mais células e menor expressão de genes pró-apoptóticos, como a caspase-3, após incubação em meio contendo 0,5  $\mu\text{M}$  de resveratrol (LEE et al., 2010). O resveratrol também teve efeito benéfico para a sobrevivência do oócito de gatas durante a vitrificação (COMIZZOLI et al., 2009).

O resveratrol, nas concentrações de 0,1 mM e 1,0 mM, aumentou a produção de progesterona pelas células do cumulus, bem como a taxa de formação do

primeiro corpúsculo polar e reduziu as EROs após MIV de oócitos bovinos (WANG et al., 2014).

Entretanto, apesar dos trabalhos descritos acima, ainda não há estudos avaliando o potencial efeito antioxidante do resveratrol sobre o desenvolvimento in vitro de folículos pré-antrais isolados em nenhuma espécie de mamíferos domésticos.

## **2.7. Técnicas para detectar viabilidade folicular, metabolismo celular e apoptose**

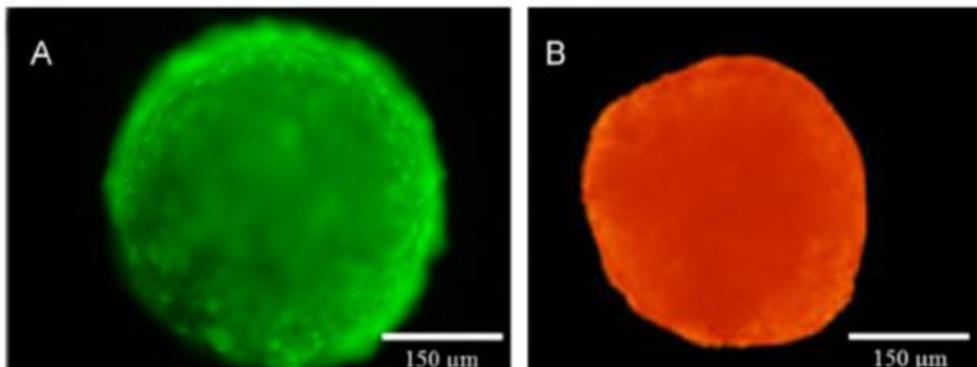
Após o desenvolvimento in vitro, é necessária a manutenção da qualidade folicular para que se tenham oócitos aptos a serem maturados e fecundados in vitro, ou que possam ser utilizados em outras biotécnicas relacionadas à reprodução animal. Dessa forma, quanto mais parâmetros e técnicas forem utilizados em conjunto para avaliar os folículos pré-antrais e antrais após o cultivo in vitro, mais precisa será a interpretação da qualidade e da viabilidade folicular (MATOS et al., 2007). Diferentes técnicas vêm sendo utilizadas, tais como histologia clássica, microscopia eletrônica de transmissão, microscopia de fluorescência e TUNEL.

### **2.7.1 Microscopia de fluorescência**

A microscopia de fluorescência utiliza marcadores fluorescentes que, quando excitados com radiação de baixo comprimento de onda, absorvem energia e emitem luz de comprimento de onda maior (JUNQUEIRA; CARNEIRO 1999). A microscopia de fluorescência é considerada uma técnica confiável, prática e rápida para analisar a viabilidade folicular (LOPES et al., 2009) e já foi utilizada para avaliar a viabilidade de folículos pré-antrais após cultivo in vitro (CHAVES et al, 2010; ROSSETO et al, 2012; DUARTE et al., 2013), em que os folículos vivos e mortos são marcados pela calceína-AM e etídio homodímero-1, respectivamente. A calceína-AM atravessa passivamente a membrana celular, quando então é convertida por esterases intracelulares, ativas somente em célula íntegra, a seu

análogo negativo, impermeável e de fluorescência verde, também conhecido como calceína (NERI et al., 2001). Com a perda da integridade ou aumento da permeabilidade da membrana, a atividade esterásica cessa e o etídio homodímero-1 (EthD-1) reage com os ácidos nucleicos, produzindo fluorescência vermelha (GATTI et al., 1998). Assim, a calceína permite a verificação da viabilidade celular através da diminuição da atividade esterásica, enquanto EthD-1 permite constatar as alterações físicas e químicas na membrana celular verificadas na membrana danificada, com elevação de 40 vezes em sua fluorescência à medida que se associa a ácidos nucleicos (MOLECULAR PROBES INCORPORATION, 1999) (Figura 5).

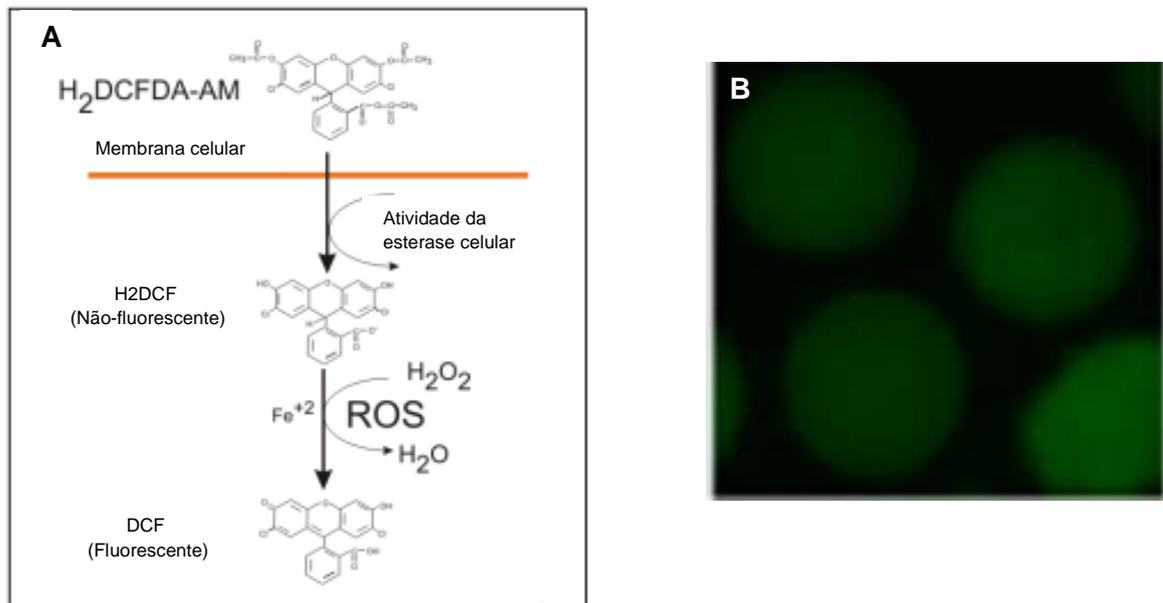
**Figura 5.** Folículos pré-antrais marcados com calceína-AM (verde) (A) e etídio homodímero-1 (vermelho) (B) (SILVA et al, 2014).



A microscopia de fluorescência é utilizada, também, para avaliar os níveis de EROs e GSH, bem como a atividade mitocondrial, uma vez que o balanço entre os pró-oxidantes e antioxidantes determina a viabilidade celular. Além disso, o estresse oxidativo pode causar danos às mitocôndrias, organelas importantes para o desenvolvimento oocitário. Para tal, são utilizados marcadores fluorescentes como diacetato de diclorodihidrofluoresceína, cell tracker blue e mitotracker red para avaliar as EROs, GSH e atividade mitocondrial, respectivamente.

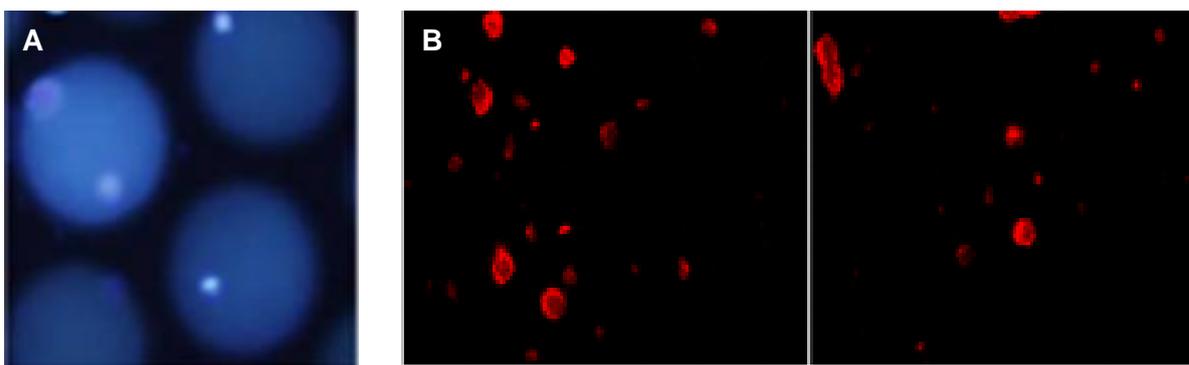
A oxidação de diclorofluorescina 2'-7' (H2DCF) para 2'-7'diclorofluoresceína (DCF) tem sido bastante utilizada para a quantificação de  $H_2O_2$ . A forma diacetato, H2 DCFDA e seu éster acetometil H2DCFDA-AM são absorvidos pelas células, onde esterases celulares não específicas atuam sobre ela para clivar os grupos lipofílicos, resultando em um composto carregado, que é retido no interior da célula. A oxidação de H2DCF por EROs converte a molécula de 2', 7' diclorodihidrofluoresceína (DCF), que é altamente fluorescente (Figura 6) (HELD, 2015).

**Figura 6.** Formação do composto fluorescente DCF por ERO (HELD, 2015) (A) e óocitos caprinos (B) maturados *in vitro* corados com diacetato diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA)



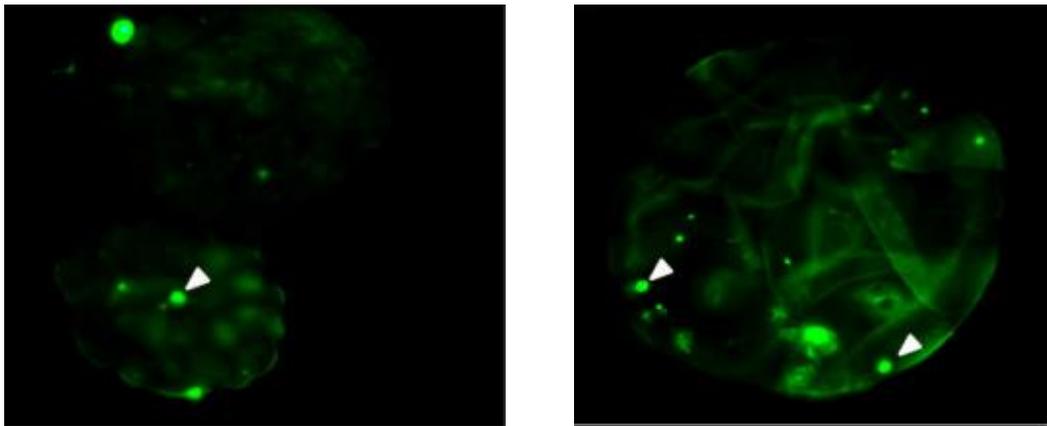
O marcador cell tracker blue passa livremente através das membranas celulares. No entanto, uma vez dentro da célula são transformados em produtos impermeabilizantes. Este marcador contém um grupo clorometil ou bromometil, que reage com grupos tiol, utilizando uma reação mediada por glutathione-S-transferase. Na maioria das células, os níveis de glutathione são elevados (até 10 mM) e a glutathione-transferase está sempre presente (MOLECULAR PROBES, 2006) (Figura 6). Já o Mitotracker red atravessa a membrana celular e se acumula nas mitocôndrias com potencial de membrana ativa (Figura 7).

**Figura 7.** Óocitos caprinos corados com Cell Tracker blue (A) (Mukherjee et al, 2014) e células da granulosa coradas com Mito tracker red (TANABE et al., 2015)



A técnica de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) é utilizada para identificação de fragmentos de DNA característicos do processo de apoptose. Nesta análise, o grupo 3'-OH do DNA fragmentado é marcado com Isotiocianato de fluoresceína (FITC) pela enzima deoxinucleotídeo transferase (Tdt), a qual catalisa a polimerização de nucleotídeos modificados no terminal 3'-OH (LIMA, 2012). O TUNEL pode ser geralmente considerado como um método para a detecção de danos no DNA (fragmentação do DNA), e mais especificamente, como um método para a identificação de células apoptóticas (Figura 8).

**Figura 8.** Embriões bovinos submetido à técnica de TUNEL . Os núcleos TUNEL-positivos foram corados em verde . Ponta de seta indica fragmentação de DNA (MIRANDA et al., 2009).



### 3. JUSTIFICATIVA

O arranjo produtivo local da ovinocultura possui enorme importância econômica e social para o semiárido nordestino. Informações sobre a fisiologia ovariana em ovinos são fundamentais para gestão do bem-estar desses animais e para um melhor desempenho reprodutivo, que poderia ser refletido no crescimento de folículos ovarianos, na maturação do oócito e na maior produção de embriões *in vitro*. Nesse sentido, o desenvolvimento de biotecnologias na área da reprodução animal, como por exemplo, o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, a MIV e a FIV, abrem inúmeras possibilidades para proporcionar um melhoramento genético dos rebanhos e um aumento na produtividade animal. Dessa forma, o estudo dos fatores que controlam o desenvolvimento folicular ovariano na espécie ovina pode ser de grande importância para o desenvolvimento agropecuário da região semiárida do Vale do São Francisco, especialmente no Estado de Pernambuco.

Uma substância que parece exercer influência sobre a fisiologia reprodutiva é o resveratrol, cujos efeitos benéficos já foram demonstradas em espermatozoides humanos e de ratos, oócitos caprinos e suínos e embriões suínos. Além disso, estudos mostraram que o resveratrol pode diminuir a formação de EROs e proteger oócitos contra o estresse oxidativo após a MIV. Por outro lado, o resveratrol exerce um papel pró-apoptótico em células da teca cultivadas *in vitro*. Entretanto, o efeito do resveratrol sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais ovinos isolados ainda não foi elucidado. Neste caso, para avaliar a eficácia do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, é de extrema importância avaliar o estresse oxidativo, o metabolismo celular e as taxas de apoptose que podem ocorrer *in vitro*.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo geral**

Estudar o efeito do resveratrol sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais ovinos isolados.

### **4.2. Objetivo específico**

Avaliar o efeito de diferentes concentrações de resveratrol sobre a morfologia, a viabilidade, a formação de antro, o crescimento, a produção GSH, a atividade mitocondrial e a apoptose após cultivo *in vitro* de oócitos inclusos em folículos pré-antrais ovinos isolados.

## **5. Capítulo 1**

Efeito do Resveratrol sobre o desenvolvimento, apoptose e atividade metabólica de  
folículos secundários ovinos

**(Effects of resveratrol on in vitro development, apoptosis and metabolic  
activity of ovine secondary follicles)**

Período: Reproduction in Domestic Animals  
(Submetido em 01/07/2015)  
Qualis A2

Efeito do Resveratrol sobre o desenvolvimento, apoptose e atividade metabólica de  
folículos secundários ovinos

**(Effects of resveratrol on in vitro development, apoptosis and metabolic  
activity of ovine secondary follicles)**

T.J.S. Macedo, V.R.P Barros, A.P.O. Monte, B.B. Gouveia, M.É.S. Bezerra, A.Y.P.  
Cavalcante, R.S. Barberino, V.G.Menezes, M.H.T. Matos\*

Núcleo de Biotecnologia Aplicada ao Desenvolvimento de folículo ovariano,  
Universidade Federal do Vale São Francisco, Petrolina, PE, Brasil

\*Endereço para correspondência:

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

## RESUMO

O resveratrol tem emergido como um composto natural com imenso potencial terapêutico. Pode atuar como um antioxidante contra o estresse oxidativo em diferentes células, no entanto, o resveratrol nunca foi utilizado no cultivo de folículos pré-antrais. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do resveratrol sobre a viabilidade, apoptose e desenvolvimento de folículos secundários ovinos isolados, bem como, o nível intracelular de GSH e atividade mitocondrial. Após a coleta dos ovários, folículos secundários foram isolados e cultivados por 18 dias em meio  $\alpha$ -MEM+ suplementado com BSA, insulina, transferrina, selênio, glutamina, hipoxantina e ácido ascórbico (meio controle) ou em meio suplementado com diferentes concentrações de resveratrol (2,0; 10,0 ou 30,0  $\mu$ M). Os parâmetros analisados foram morfologia, formação de antro, diâmetro, taxa de crescimento, apoptose através da técnica de TUNEL, níveis de GSH e atividade mitocondrial. Todos os grupos de resveratrol diminuíram significativamente a porcentagem de folículos morfologicamente normais no dia 18 comparado com o grupo controle ( $\alpha$ -MEM+). A formação de antro foi maior em folículos cultivados em  $\alpha$ -MEM+ sozinho ou adicionado de 2  $\mu$ M de resveratrol do que aqueles folículos cultivados na presença de 10  $\mu$ M de resveratrol. Além disso, os folículos cultivados com 30  $\mu$ M resveratrol mostraram maior porcentagem de oócitos apoptóticos quando comparados ao grupo controle. Oócitos de folículos tratados com 10 e 30  $\mu$ M resveratrol diminuíram significativamente os níveis intracelulares de GSH comparados com 2  $\mu$ M resveratrol. Além disso, folículos cultivados em  $\alpha$ -MEM+ (controle) mostraram maior atividade mitocondrial do que folículos cultivados com 10 e 30  $\mu$ M resveratrol. Em conclusão, esse estudo mostrou que o resveratrol, em altas concentrações, diminui a viabilidade folicular e promove apoptose no oócito, após cultivo *in vitro* de folículos secundários ovinos, pela diminuição dos níveis de GSH e atividade metabólica.

Palavras-chave: Pré-antral, Polifenol, Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), Viabilidade, TUNEL

## 1. INTRODUÇÃO

O cultivo *in vitro* de folículos é uma estratégia promissora de preservação da fertilidade (HORNICK et al., 2012), que imita o processo que ocorre *in vivo*, a fim de investigar a fisiologia subjacente e gerar um oócito totalmente crescido capaz de sofrer maturação e fertilização bem sucedidas (CECCONI, 2002). No entanto, no cultivo *in vitro* os oócitos são mantidos em atmosfera com nível de oxigênio mais elevado do que no ambiente *in vivo*, levando a um aumento do nível de espécies reativas de oxigênio (EROs) (WANG et al., 2007). Em concentrações fisiológicas, as EROs participam em processos celulares normais (CHIARUGI e FIASCHI, 2007; PARKER et al., 2011). Entretanto, o aumento dos níveis de EROs dentro das células provoca danos na membrana celular por peroxidação lipídica (DALLE-DONNE et al., 2006; DEAVALL et al., 2012), fragmentação do DNA (HALLIWELL et al., 1991; AGARWAL et al., 2014) e influência na transcrição do RNA e síntese proteica (TAKAHASHI et al., 2000; DEAVALL et al., 2012).

*In vivo*, os efeitos prejudiciais de EROs são normalmente impedidos ou limitados por antioxidantes endógenos, que incluem as enzimas, tais como glutathione peroxidase (GPX) (HALLIWELL, 2011). A glutathione (GSH) pode desempenhar um papel importante em muitos processos biológicos incluindo a síntese de DNA e proteínas, a proteção celular durante o estresse oxidativo, e a proliferação celular durante eventos embrionários (GARCÍA-GIMÉNEZ et al., 2013; Timme-Laragy et al., 2013). Além disso, uma redução da tolerância ao estresse no tecido poderia resultar numa alteração do metabolismo aeróbico do tecido com consequente disfunção mitocondrial e estresse oxidativo (FABBRI et al., 2014).

Portanto, o elevado nível de glutathione e atividade metabólica são relevantes potenciais marcadores bioquímicos da viabilidade e da capacidade de desenvolvimento de oócitos mamíferos (ZUELKE et al., 2003; CASTANEDA et al., 2013). Assim, o estabelecimento de um sistema de cultivo *in vitro*, com elevados níveis de GSH intracelular e atividade metabólica pode melhorar a viabilidade dos oócitos e contribuir para o desenvolvimento de tecnologias de reprodução assistida em espécies animal e humana. No entanto, durante o cultivo *in vitro*, o nível de antioxidantes naturais é menor do que *in vivo*, por conseguinte, a adição de um antioxidante pode ser importante para melhorar os resultados do cultivo folicular. O

resveratrol é uma substância protetora que pode ser adicionado ao meio de cultivo de folículos ovarianos.

O resveratrol é um polifenol natural que pertence à classe dos estilbenos e é um termo comum para 3,5,4V-hidroxiestilbeno. Resveratrol existe em ambas as formas isoméricas cis e trans, no entanto, o isômero trans é de longe o mais comumente encontrado em plantas e extensivamente estudado (SIGNORELLI e GHIDONI, 2005). Alguns estudos relatam que o resveratrol exibe ampla variedade de propriedades farmacológicas como cardioprotetora, anticancerígena, anti-inflamatória (SUBBARAMAIAH et al., 1998; BAUR e SINCLAIR, 2006; MENG et al., 2014) e efeito antioxidante (MORITA et al., 2012). Além disso, estudos in vivo mostraram que o pré-tratamento com resveratrol em ratas irradiadas protege a contagem dos folículos ovarianos e aumenta os níveis teciduais de enzimas antioxidantes (SIMSEK et al., 2012).

A suplementação de resveratrol na concentração ótima durante a MIV de oócitos suínos (KWAK et al., 2012) e caprinos (MUKHERJEE et al., 2014) estimulou o desenvolvimento embrionário através do aumento da GSH intracelular e diminuição dos níveis de ERO. No entanto, o resveratrol inibe o crescimento de células da teca de rata diminuindo a síntese de DNA e induzindo efeitos pró-apoptóticos (WONG et al., 2010). No entanto, não existe relatos em que o resveratrol tem sido usado como agente antioxidante no cultivo in vitro de folículos pré-antrais ovinos. O objetivo do presente estudo foi determinar se a adição de resveratrol no meio de cultivo influenciaria na viabilidade, apoptose e desenvolvimento de folículos secundários ovinos isolados, bem como o nível de GSH intracelular e atividade mitocondrial.

## **2. Material e métodos**

### **2.1 Fonte dos ovários**

Os ovários (n = 50) foram coletados em abatedouro local a partir de 25 ovelhas mestiças adultas (1-3 anos de idade), não prenhes. Imediatamente após o abate, os pares de ovários foram lavados uma vez em álcool 70% e, em seguida, duas vezes em Meio Essencial Mínimo tamponado com HEPES (MEM- HEPES), suplementado com antibióticos (100 µg/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina). Os ovários foram transportados ao laboratório durante uma hora em tubos contendo MEM- HEPES e antibióticos (100 µg/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina), a 4 °C (CHAVES et al., 2008).

### **2.2 Isolamento e seleção de folículos pré-antrais**

No laboratório, o tecido adiposo circundante e ligamentos foram removidos dos ovários. Fatias corticais do ovário (1 a 2 mm de espessura) foram cortadas a partir da superfície do ovário utilizando uma lâmina cirúrgica sob condições estéreis e em seguida colocados em meio de fragmentação que consistiu em MEM-HEPES com antibióticos. Folículos pré-antrais ovinos, com aproximadamente 250-400 µm de diâmetro sem cavidade antral, foram visualizados sob um estereomicroscópio (S MZ 645 Nikon, Tokyo, Japão) e isolados mecanicamente por microdissecção usando agulhas de calibre de 26 gauges (26G). Estes folículos foram então transferidos para gotas de 100 µL contendo meio de cultivo de base para a avaliação da qualidade folicular. Somente folículos secundários que exibiam as seguintes características foram selecionados para o cultivo: uma membrana basal intacta, duas ou mais camadas de células da granulosa circundando um oócito saudável e visível localizado centralmente, sem apresentar citoplasma escuro. Os folículos isolados foram reunidos e, em seguida, distribuídos aleatoriamente em grupos de tratamento, com aproximadamente 45-50 folículos por grupo.

### 2.3 Cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais

Após seleção, os folículos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de estudo e cultivados individualmente (um folículo por gota) em gotas de 100  $\mu$ L de meio de cultivo sob óleo mineral em placas de petri (60 x 15 mm, Corning, EUA). O meio de controle de base foi constituído de  $\alpha$ -MEM (pH 7,2-7,4) suplementado com 3,0 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), 10 ng/mL de insulina, 5,5  $\mu$ g/mL de transferrina, 5,0 ng/mL de selênio, 2 mM de glutamina, 2 mM de hipoxantina e 50  $\mu$ g/mL de ácido ascórbico, sendo denominado de  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>. Para as condições experimentais, o meio de controle foi suplementado com resveratrol em diferentes concentrações (2,0; 10,0 ou 30,0  $\mu$ M). Todos os folículos foram cultivados a 37 °C sob 5% de CO<sub>2</sub> durante 18 dias. A cada dois dias, 60  $\mu$ L do meio de cultivo era substituído por meio fresco.

### 2.4 Avaliação morfológica do desenvolvimento folicular

Durante e após o cultivo, os folículos foram classificados de acordo com suas características morfológicas, e aqueles que apresentaram sinais morfológicos de degeneração, como oócitos e células da granulosa circundantes escuros, oócitos disformes, ruptura da membrana basal e/ou extrusão de oócitos foram classificados como degenerados. As análises de viabilidade folicular foram realizadas a cada seis dias de cultivo.

As seguintes características foram analisadas nos folículos morfológicamente normais: (i) formação de cavidade antral, definidas como o surgimento de uma cavidade translúcida visível dentro das camadas de células da granulosa, (ii) diâmetro dos folículos saudáveis, medido a partir da membrana basal, que incluiu duas medidas perpendiculares de cada folículo, e (iii) a taxa de crescimento, calculados como a variação do diâmetro durante o período de cultivo. Após 18 dias de cultivo, todos os folículos saudáveis foram cuidadosamente e mecanicamente rompidos com agulhas de 26 G sob estéreomicroscópio para recuperar os oócitos ( $\geq 110 \mu$ m). A percentagem de recuperação de oócitos foi calculado como o número

de oócitos de qualidade aceitável ( $\geq 110 \mu\text{m}$ ) recuperados a partir do número total de folículos cultivados.

## 2.5 TUNEL

Para avaliar a fragmentação do DNA, oócitos foram submetidos ao ensaio de TUNEL por métodos anteriormente descritos (LIMA, 2012). Resumidamente, após o cultivo *in vitro* os oócitos foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% durante 1 h à temperatura ambiente. Os oócitos foram lavados três vezes em PBS/PVP e após a fixação os oócitos foram armazenados a 4 °C em eppendorf com 400  $\mu\text{L}$  de PBS-PVP até o início do procedimento de TUNEL.

Para o ensaio de TUNEL os oócitos foram incubados em gotas de 100  $\mu\text{L}$  de solução de permeabilização [0,1% (v/v) de Triton X-100 em PBS 10 mM] durante 3 h à temperatura ambiente. Os controles positivos e negativos foram incubados em gotas de 100  $\mu\text{L}$  contendo DNase livre de RNase (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) a 37 °C durante 1 h e lavados 3 vezes em gotas de 50  $\mu\text{L}$  de PBS-PVP. O ensaio de TUNEL foi preparado cerca de 15 minutos antes da utilização e mantido, tal como indicado pelo fabricante a 4 °C (Kit de detecção celular *in situ*, Fluoresceína: Boehringer Mannheim/Roche Diagnosticos; 1.684.795). Para esta utilização final foi feito 12,5  $\mu\text{L}$  de enzima DTT e 112,5  $\mu\text{L}$  de solução marcadora de 2-desoxiuridina trifosfato de 5-FITC (FITC-dUTP) para se obter 125  $\mu\text{L}$  de mistura de TUNEL para a reação. Os grupos experimentais e o controle positivo foram incubados com 15  $\mu\text{L}$  desta solução durante 1 hora a 37 °C numa câmara húmida, no escuro. O controle negativo foi incubado com 15  $\mu\text{L}$  da solução marcadora. Os oócitos foram lavados 3 vezes em gotas de 50  $\mu\text{L}$  PBS-PVP e incubados em gotas de 50  $\mu\text{L}$  contendo 5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de Hoechst 33342 em PBS 10 mM durante 15 minutos à temperatura ambiente no escuro. Os oócitos foram lavados 3 vezes em gotas de 50  $\mu\text{L}$  de PBS-PVP e as lâminas foram preparadas para posterior leitura sob um microscópio de epifluorescência. (Nikon E200) com uma ampliação de 400x.

## 2.6 Mensuração dos níveis intracelulares de GSH

Após 18 dias de cultivo, os oócitos foram recuperados para determinar os níveis intracelulares de GSH. Níveis de GSH foram mensurados pelos métodos anteriormente descritos (KEERE et al., 2013), com pequenas modificações. Resumidamente, 4-clorometil-6.8-difluoro-7-hidroxycumarina (CellTracker azul; CMF2HC; Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), foi utilizado para a detecção intracelular de GSH, como fluorescência azul. De seis a oito oócitos de cada grupo foram incubados (no escuro) durante 30 minutos em PBS suplementado com 10 mM de CellTracker. Após a incubação, os oócitos foram lavados com PBS e a fluorescência foi observada num microscópio de epifluorescência (E200; Nikon Corp.) com filtro de UV (370 nm para GSH). Imagens fluorescentes foram salvas como formato de imagem TIFF. As intensidades de fluorescência dos oócitos foram analisadas utilizando o software ImageJ (versão 1.47; National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA) e normalizados para os oócitos controle.

## 2.6 Avaliação da atividade mitocondrial

Após o cultivo *in vitro*, os oócitos foram recuperados, desnudados e corados para avaliação mitocondrial através de métodos anteriormente descritos (FABRI et al., 2014), com pequenas modificações. Resumidamente, os oócitos foram incubados em PBS com 100 nM Mitotracker Red (Mitotracker® Red, CMXRos, Molecular Probes, Melbourne, Victoria, Austrália) a 37 °C. Após a incubação com sondas específicas para mitocôndrias, os oócitos foram lavados em PBS e avaliados por meio de um microscópio de epifluorescência (E200; Nikon Corp.) com ampliação de 400 x. As imagens fluorescentes foram salvas como formato de imagem TIFF e a intensidade de fluorescência dos oócitos foi mensurada usando o software Image J. (NIH, Bethesda, MD, EUA).

## 2.7 Análise estatística

Os dados de sobrevivência folicular, folículos extrusos, formação antro e recuperação de oócitos crescidos após o cultivo *in vitro* foram expressos em porcentagem e comparados pelo teste do qui-quadrado. Os Dados de GSH, atividade mitocondrial, taxas de diâmetro e de crescimento folicular foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificar a distribuição normal dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Em seguida foram comparados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Quando os efeitos principais ou interações foram significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Student Newman Keuls. Os dados de apoptose (TUNEL) foram submetidos ao teste Exato de Fisher, e expressos em porcentagem. Estes resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), e as diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## 3. Resultados

### 3.1 Morfologia e desenvolvimento folicular após a cultivo *in vitro*

Os folículos morfologicamente normais mostraram oócitos localizados centralmente e células da granulosa normais, que foram circundados por uma membrana basal intacta (Fig. 1A). No dia 6 de cultivo, uma pequena cavidade antral (Fig. 1B), folículos atrésicos (Fig. 1C) e extrusos (Fig. 1D) foram observados em todos os tratamentos. A porcentagem de folículos morfologicamente normais, após o cultivo *in vitro* é mostrada na Figura 2. Com a progressão do cultivo para 18 dias, houve uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) na porcentagem de folículos morfologicamente normais em todos os tratamentos. Considerando o mesmo período de cultivo, as porcentagens de folículos normais foram semelhantes ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos controle e resveratrol, no dia 12 de cultivo. No entanto, todos os grupos do tratamento com resveratrol diminuíram significativamente a sobrevivência folicular no dia 18 em comparação com o grupo controle ( $\alpha$ -MEM +).

A partir do dia 6 de cultivo, a formação de cavidade antral foi observada em todos os tratamentos (Fig. 3). No final do cultivo, a formação de antro foi maior em ambos os tratamentos  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> e resveratrol 2 quando comparados a 10  $\mu$ M ( $p < 0,05$ ). Não houve diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) no diâmetro folicular, taxa de crescimento diário ou na percentagem de oócitos maiores do que 100  $\mu$ M, no final do cultivo, entre os tratamentos (dados não apresentados).

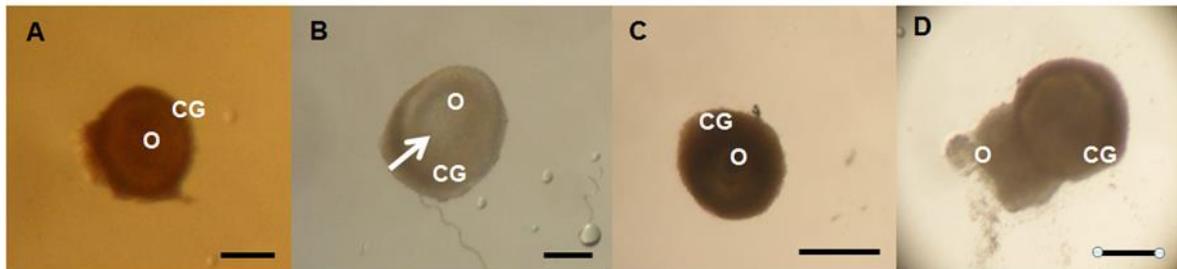


Figura 1. Folículos secundários morfologicamente normais no dia 0 (A); folículo antral, atrésico (C) e extruso após 6 dias de cultivo em 30  $\mu$ M resveratrol (D). O: oócito; CG: célula da granulosa; seta: cavidade antral. Barra de escala: 200  $\mu$ m.

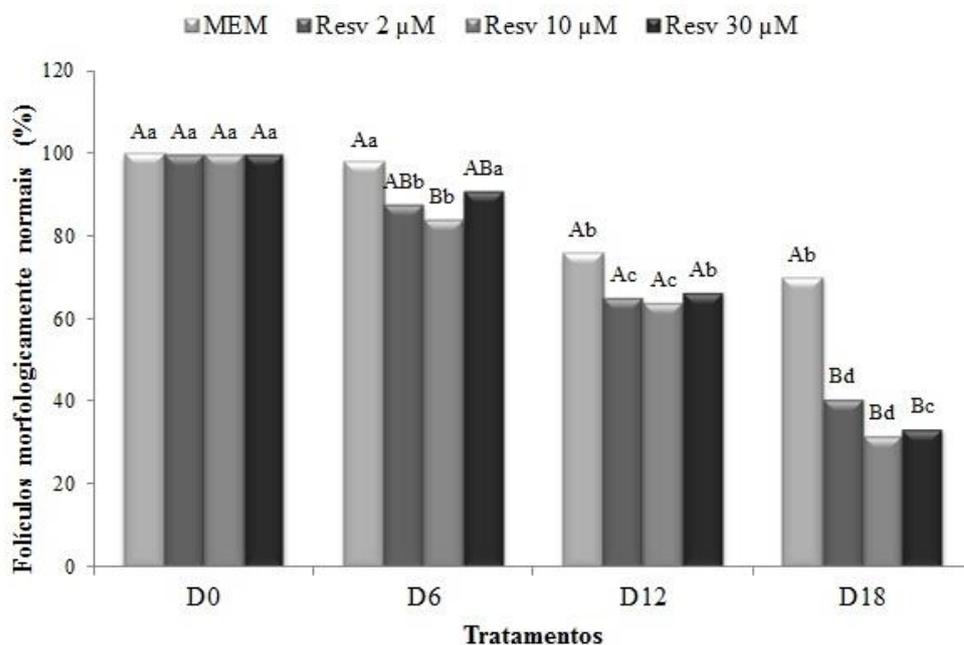


Figura 2. Percentagem de folículos morfologicamente normais cultivados em  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> ou diferentes concentrações de Resveratrol (Resv 2; 10 ou 30  $\mu$ M).<sup>(a,b)</sup> Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os períodos de cultivos no mesmo tratamento ( $P < 0,05$ ). <sup>(A,B)</sup> Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo período ( $P < 0,05$ ).

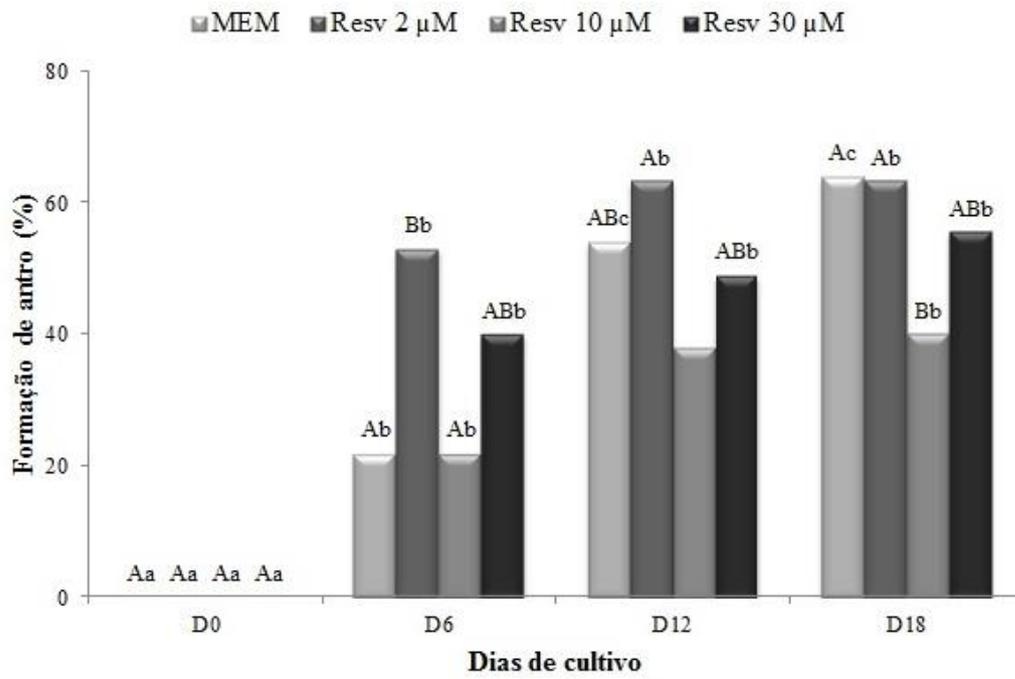


Figura 3. Percentagem de formação de cavidade antral de folículos cultivados em  $\alpha$ -MEM+ ou diferentes concentrações de Resveratrol (Resv 2; 10 ou 30  $\mu$ M).<sup>(a,b)</sup> Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os períodos de cultivos no mesmo tratamento ( $P < 0.05$ ). <sup>(A,B)</sup> Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo período ( $P < 0,05$ ).

### 3.2 Detecção de apoptose no oócito pela técnica de TUNEL

A técnica de TUNEL revelou a presença de oócitos apoptóticos em todos os tratamentos, após 18 dias de cultivo. O grupo controle ( $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>) consistiu, principalmente, de oócitos saudáveis (Fig. 4A). No entanto, folículos cultivados com resveratrol a 30  $\mu$ M mostraram uma percentagem significativamente mais elevada (62,5%) de oócitos apoptóticos (Fig. 4B), quando comparado com o grupo controle (14,3%) (Fig. 5). No entanto, não foram observadas diferenças em oócitos TUNEL-positivos entre  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>, resveratrol 2 ou 10  $\mu$ M ( $P > 0,05$ ).

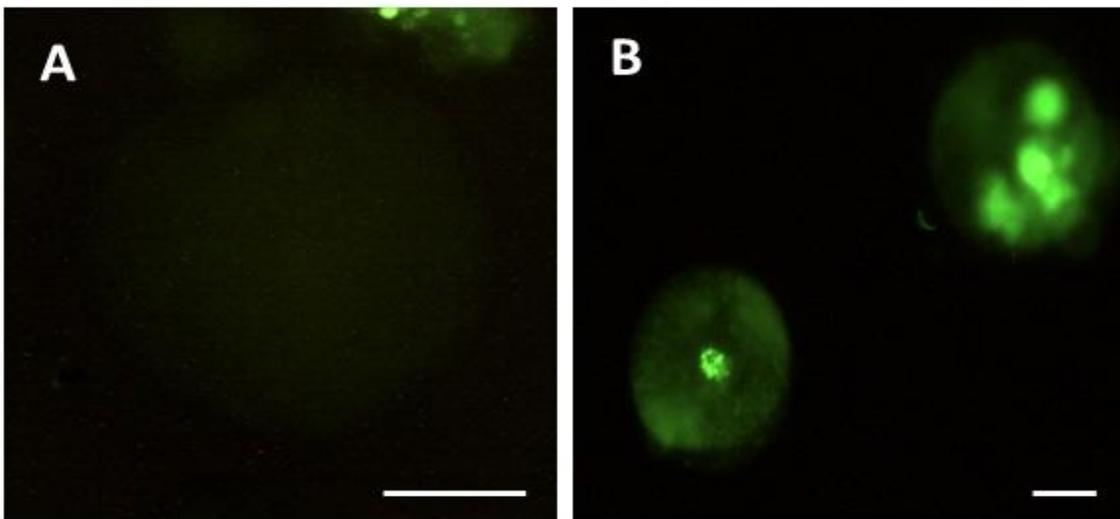


Figura 4. Identificação de oócitos apoptóticos, através do TUNEL, após 18 dias de cultivo *in vitro*. (A) Oócitos normais do grupo controle e (B) oócitos TUNEL-positivos (células em verde) do grupo 30  $\mu$ M de resveratrol.

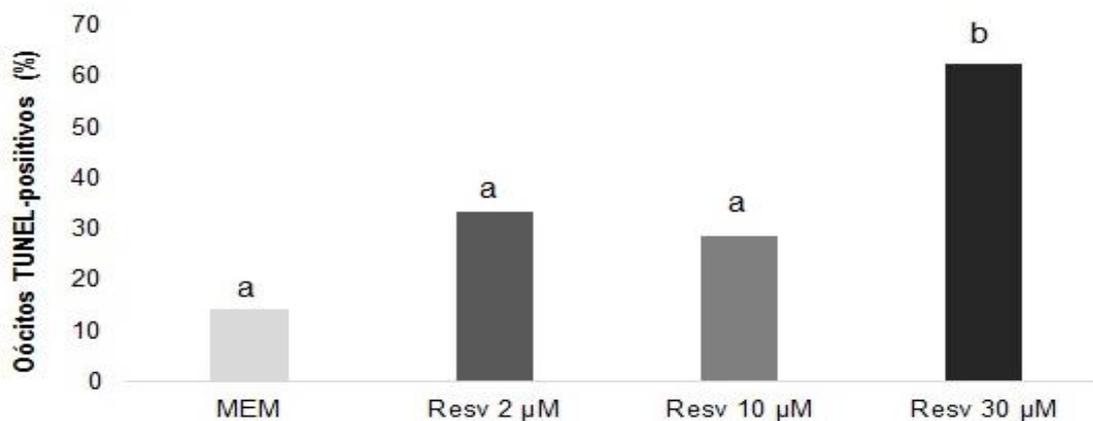
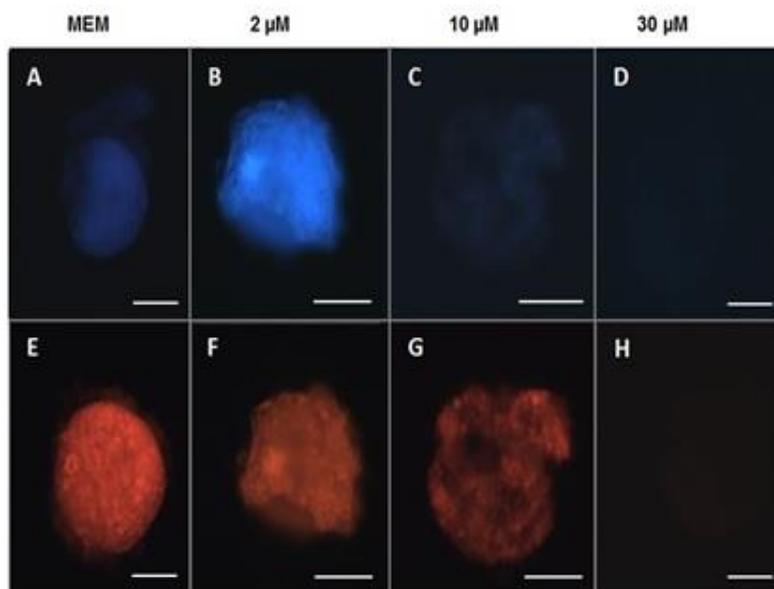


Figura 5. Percentagem (média  $\pm$  EPM) de oócitos TUNEL-positivos após 18 dias de cultivo em diferentes concentrações de resveratrol. (<sup>a,b</sup>) Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0.05$ )

### 3.3 Efeitos do resveratrol sobre os níveis intracelulares de GSH e atividade mitocondrial

Os oócitos de folículos tratados com resveratrol a 10 e 30  $\mu\text{M}$  diminuiu significativamente ( $P < 0,05$ ) os níveis de GSH intracelular em comparação com resveratrol a 2  $\mu\text{M}$  (Fig. 6A). Além disso, o grupo de controle ( $\alpha\text{-MEM}^+$ ) mostrou mitocôndrias mais ativas do que os grupos de resveratrol a 10 e 30  $\mu\text{M}$  (Fig. 6B).

(a)



(b)

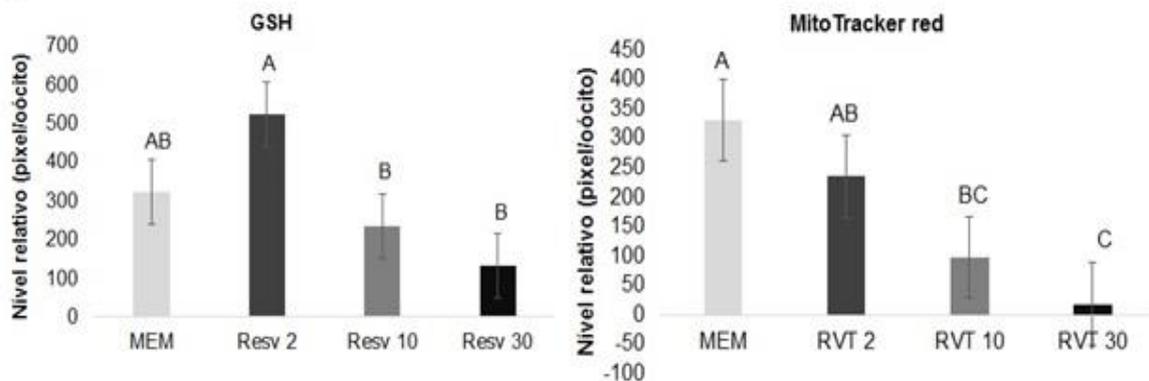


Figura 6. Imagens epifluorescentes de oócitos ovinos cultivados. (a) Oócitos foram corados com CellTracker Blue (A-D) e MitoTracker red (E-H) para detectar os níveis de glutathiona (GSH) e atividade mitocondrial, respectivamente. Oócitos cultivados no grupo controle (A e E) ou com 2,0 (B e F), 10,0 (C e G) ou 30  $\mu\text{M}$  (D e H) de resveratrol. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$  (b) Efeito do tratamento resveratrol no meio de cultivo in vitro sobre os níveis intracelulares de GSH e atividade mitocondrial em oócitos de ovelhas (C). Dentro de cada grupo (GSH e Mitocôndria Ativa), do ponto final, barras com diferentes letras (A-C) são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

## 4. Discussão

Para nosso conhecimento, este estudo é o primeiro relato avaliando os efeitos do resveratrol no cultivo de folículos ovarianos pré-antrais de ovelhas. O presente estudo mostrou que sob as condições testadas o resveratrol afetou negativamente a sobrevivência e desenvolvimento folicular através do: (i) aumento do apoptose, (ii) diminuição dos níveis de GSH e (iii) redução da atividade metabólica.

Na última década, resveratrol emergiu como um composto natural com potencial terapêutico imenso (Wong et al., 2010). Ele é encontrado em altas concentrações em uvas, nozes e vinho tinto com benefícios anti-carcinogênico, anti-inflamatório, antioxidante e propriedades cardioprotetoras (JIANG et al., 2005). Estudos recentes tem demonstrado que o resveratrol pode atuar como um antioxidante contra o estresse oxidativo em diferentes tipos de células (oócitos: KWAK et al., 2012; espermatozóides: ÜNAL et al., 2013; células renais: VALENTOVIC et al., 2014). Entretanto, em nosso sistema de cultivo *in vitro*, a porcentagem de folículos morfológicamente normais foi menor em meio contendo resveratrol (2, 10 ou 30  $\mu\text{M}$ ) e a taxa de apoptose foi maior com 30  $\mu\text{M}$  de resveratrol comparado com o grupo controle ( $\alpha\text{-MEM}^+$ ). Após cultivo de células intersticiais da teca, Wong et al. (2010) também observaram que o resveratrol reduziu a viabilidade de maior número de células em concentrações mais altas (70 e 100  $\mu\text{M}$ ) bem como induziu um aumento dose-dependente de caspase-3/7 ativada e fragmentação de DNA nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{M}$  de resveratrol. Em seu estudo, 30  $\mu\text{M}$  de resveratrol não aumentou a apoptose celular. O resveratrol pode modular a atividade de muitos mediadores chaves do ciclo e sobrevivência celular. Portanto, o resveratrol pode participar em ambos os mecanismos celulares de pró-sobrevivência e pró-morte, favorecendo a preservação do estado funcional das células e possivelmente alongando um período de vida da célula, e induzindo a morte de células cujas condições fisiológicas tornaram-se desequilibradas (SIGNORELLI; GHIDONI, 2005).

Estudos revelam que o resveratrol pode se ligar à proteína de superfície celular, como as integrinas, e promover a apoptose. As integrinas são glicoproteínas heterodiméricas estruturais de membrana plasmática cujos domínios extracelulares ligam-se à proteínas de matriz extracelulares e outros fatores (PLOW et al., 2000).

Resveratrol liga-se ao domínio intracelular da integrina  $\alpha\beta_3$ , ativa a via das quinases reguladas extracelulares 1 e 2 (ERK1 / 2) com a consequente fosforilação de serina-15-p53, resultando na apoptose de células cancerígenas (LIN et al., 2003). Uma vez que a expressão de RNAm de várias integrinas foi descrita anteriormente em ovários de camundongos fêmeas (BURNS et al., 2002), é provável que o resveratrol se ligue à essas proteínas e promova a apoptose. Outra possibilidade é que, depois da auto-oxidação ou degradação, o resveratrol pode gerar complexos com outras moléculas, tais como íons de cobre. Como efeito, o produto oxidativo do resveratrol é um dímero, e a transferência de elétrons inicial gera a redução de Cu (II) a Cu (I). Assim, o complexo cobre-peróxido é capaz de se ligar ao DNA e formar um complexo ternário DNA-resveratrol-Cu (I) (RADI et al., 2010). Este complexo pode favorecer a fragmentação do DNA internucleossômica, o que é uma característica da apoptose (DELMAS et al., 2011). No entanto, no presente estudo, não está claro por qual mecanismo o resveratrol promove a apoptose.

Falha dos mecanismos de defesa antioxidantes para neutralizar o estresse oxidativo permite que as EROs alterem o estado redox celular (redução-oxidação), com a diminuição da capacidade antioxidante total em folículos acompanhado de fertilização de oócitos de má qualidade (OYAWOYE et al., 2003). Alguns estudos têm demonstrado que o resveratrol exerce seus efeitos antioxidantes pela modulação de enzimas antioxidantes, tais como GSH, diminuindo assim os níveis de EROs (SIMSEK et al., 2012; KWAK et al., 2012; MUKHERJEE et al., 2014). Por outro lado, no presente estudo, o resveratrol a 10 ou 30  $\mu\text{M}$  reduziu os níveis intracelulares de GSH em comparação com a concentração mais baixa (2  $\mu\text{M}$ ). Podemos supor que o resveratrol pode atuar como agente pró-oxidante em concentrações elevadas, reduzindo os níveis de enzimas antioxidantes, provavelmente, aumentando a produção de EROs, promovendo assim a apoptose nos oócitos ovinos. Além disso, além das diferenças espécie-específicas, o resveratrol pode funcionar como um agente pró-oxidante, bem como um antioxidante, dependendo da concentração administrada às células e dos tipos de células (DELMAS et al., 2011).

As mitocôndrias, as organelas mais abundantes em oócitos mamíferos, desempenham um papel primordial durante a maturação citoplasmática (HARRIS et al., 2010). O estresse oxidativo provoca danos nas mitocôndrias, levando a disfunção mitocondrial (TANABE et al., 2015). Avaliação do metabolismo do tecido

proporciona uma indicação das atividades bioenergéticas mitocondriais normais, incluindo a geração de trifosfato de adenosina, homeostase do cálcio, transdução de sinal, regulação do estado redox citoplasmático e, assim, a produção de EROs. Por isso, estes parâmetros (GSH e atividade mitocondrial) foram escolhidos, pois ambos estão relacionados com a capacidade de fertilização e desenvolvimento de oócitos (MCEVOY et al., 2000; CUMMINS, 2004; CASTANEDA et al., 2013). No nosso sistema de cultivo, as concentrações mais elevadas de resveratrol (10 e 30  $\mu\text{M}$ ) reduziram a atividade mitocondrial. Um mecanismo da atividade antiproliferativa do resveratrol é a ativação da via apoptótica intrínseca, a liberação mitocondrial de citocromo c e o envolvimento da Bax, geração de EROs, modulação da via p53 e a ativação da via extrínseca do receptor de morte (DELMAS et al., 2011). Especificamente, o resveratrol interfere com a cadeia respiratória mitocondrial, e conduz ao aumento da produção de EROs (WALLACE, 1999). O estado redox das células desempenha um papel importante em muitos tipos de apoptose e as EROs produzidas ao nível das mitocôndrias podem estar envolvidas na morte celular (MIGNOTTE; VAYSSIERE, 1998).

No estudo atual, a formação de antro foi maior nos tratamentos  $\alpha\text{-MEM}+$  e 2  $\mu\text{M}$  de resveratrol do que em 10  $\mu\text{M}$  resveratrol. No entanto, nenhum efeito sobre o crescimento folicular foi observado. Após a formação do antro, o folículo começa a depender de FSH (ERICKSON; SHIMASAKI, 2001), sugerindo que a utilização de FSH no meio de cultivo de base pode ser necessária para dar um grande suporte para o crescimento de folículos antrais. No entanto, a suplementação de resveratrol (0,24 e 0,5  $\mu\text{M}$ ) durante a MIV de oócitos de cabra melhora o potencial desenvolvimento embrionário (MUKHERJEE et al., 2014), mostrando, assim, que na concentração ótima, o resveratrol pode ser importante para o crescimento de oócitos. Portanto, acreditamos que concentrações de resveratrol inferiores a 2  $\mu\text{M}$  podem ser consideradas ideais para promover o desenvolvimento de folículos secundários ovinos.

Em conclusão, altas concentrações de resveratrol diminuem a viabilidade folicular e promovem a apoptose de oócitos após cultivo *in vitro* de folículos secundários ovinos, através da diminuição dos níveis de GSH e da atividade metabólica. Como o resveratrol tem concentrações e efeitos dependentes das células, estudos futuros devem ser feitos para investigar a concentração adequada para a suplementação de meio de cultivo celular.



## 5. Conclusão

Em altas concentrações, o resveratrol diminui a viabilidade folicular e promove apoptose em oócitos após cultivo *in vitro* de folículos secundários ovinos, por meio da redução dos níveis de GSH e atividade metabólica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRRE, S. A. et al. Cell death mechanisms during follicular atresia in *Dipetalogaster maxima*, a vector of Chagas' disease (Hemiptera: Reduviidae). **Journal of Insect Physiology** ., v. 59, p. 532–541, 2013

ANDRADE, E.R. et al. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal.**, Belo Horizonte, v.34, n.2, p.79-85, abr./jun. 2010.

ANDRADE, E.R. et al. Effects of ascorbic acid on in vitro culture of bovine preantral follicles. **Zygote**, v.5, p.1-10, 2012.

ARAÚJO, V. R. et al. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology.**, v.12, p. 1-14, 2014.

ARAÚJO, V.R. et al. Effect of culture medium replacement protocol on the in vitro development of isolated caprine secondary follicles. **Small Ruminant Research.**, v.95, 139-143, 2011.

BARBERINO, R.S. et al. Amburana cearensis leaf extract maintains survival and promotes in vitro development of ovine secondary follicles. **Zygote**. p. 1-9, 2015. doi:10.1017/S0967199415000179

BARBOSA, M. R. et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44. p. 453-460, 2014.

BARROS, V.R.P. et al. Immunolocalization of Melatonin and Follicle-Stimulating Hormone Receptors in Caprine Ovaries and their Effects During in vitro Development of Isolated Pre-Antral Follicles. **Reproduction in Domestic Animals.**, v.48, 1025–1033, 2013.

BIRK, O.S. et al. The LIM homeobox gene *Lhx9* is essential for mouse gonad formation. **Nature**, v. 403, p. 909–913, 2000.

BITGUL, G. et al. Protective Effects of Resveratrol against Chronic Immobilization Stress on Testis, **ISRN Urology.**, p.1-10, 2013. doi.org/10.1155/2013/278720.

BOWERS, J.L. et al. Resveratrol Acts as a Mixed Agonist/Antagonist for Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . **Endocrinology**. v. 141, p. 3657-3667, 2000.

BRANCO, C.S. et al. Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. **Cryobiology**, v. 60, p. 235-7, 2010.

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

BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T. K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). **Theriogenology**, v.66. p.5-13, 2006.

BUKOVSKI, A. et al. Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reprod Biol*. **Endocrinology**, v. 4, p. 2-20, 2004.

BURNS, K.H. et al. Characterization of Integrin Expression in the Mouse Ovary. **BIOLOGY OF REPRODUCTION**, v. 67, p.743–751, 2002.

CECCONI, S. et al. Effect of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Vasoactive Intestinal Polypeptide on Mouse Preantral Follicle Development *in Vitro*. **Endocrinology**, v. 145 p. 2071-2079, 2004.

CHAVES, R. N. et al. Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goatpreantral follicles cultured in vitro. **Reproduction, Fertility and Development**., v. 20, p. 640–647, 2008.

CHAVES, R. N. et al. Fibroblast growth factor-10 maintains the survival and promotes the growth of cultured goat preantral follicles. **Domestic Animal Endocrinology**., v.39, p.249 –258, 2010.

CHEN, Z-H. et al. Resveratrol inhibits TCDD-induced expression of CYP1A1 and CYP1B1 and catechol estrogen-mediated oxidative DNA damage in cultured human mammary epithelial cells. **Carcinogenesis**, v. 25, p.2005-2013, 2004.

CHIPUK, J. E.; GREEN, D. R. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? **Trends in Cell Biology**., v. 18, p.157-164, 2008.

CLÉMENT, M. V. et al. Chemopreventive Agent Resveratrol, a Natural Product Derived From Grapes, Triggers CD95 Signaling Dependent Apoptosis in Human Tumor Cells. **Blood**, v. 92, p. 996-1002, 1998.

COMIZZOLI, P.; WILDT, D.E.; PUKAZHENTHI, B.S. In vitro compaction of germinal vesicle chromatin is beneficial to survival of vitrified cat oocytes. . **Reproduction in Domestic Animals.**, v. 44, p. 269-274, 2009.

DELMAS, D. et al. Transport, stability, and biological activity of resveratrol. **New York Academy of Sciences.**, v. 1215, p.48-59, 2011.

DELMAS, D.; SOLARY, E.; LATRUFFE, N. Resveratrol, a phytochemical inducer of multiple cell death pathways: Apoptosis, autophagy and mitotic catastrophe. **Current Medicinal Chemistry.**, v. 18, p.1100–1121, 2011.

DRIANCOURT, M. A.; WEBB, R.; FRY, R. C. Does follicular dominance occur in ewe? **Journal of Reproduction & Infertility.**, v.93, p.63-70, 1991.

DUARTE, A.B.G. et al. Insulin-like growth factor II (IGF-II) and follicle stimulating hormone (FSH) combinations can improve the in vitro development of grown oocytes enclosed in caprine preantral follicles. **Growth Hormone & IGF Research.**, v. 23, p. 37–44, 2013.

FAVALORO, B. et al. Role of Apoptosis in disease. **Aging**, v.4, p.330-349, 2012.

FIGUEIREDO, J. R. et al. Advances in artificial ovary in goats. **Acta Sci. Vet.**, v. 38, p. 417-477, 2010.

FIGUEIREDO, J. R. et al. Desenvolvimento e aplicações do ovário artificial em caprinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal Supl**, Belo Horizonte, n.6, p.55-58, 2009.

FIGUEIREDO, J. R. et al. **Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais.** In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF (Org.). Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2. ed. São Paulo: Editora Roca, 2008. v.1, p.303-327.

FIGUEIREDO, J. R. et al. **Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais**. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal, 2. ed. São Paulo: Roca, 2008, p. 303–327.

FIGUEIREDO, J.R. Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability *in vitro*. **Zygote**, v. 15, p. 173-182, 2007.

FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development, p. activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science.**, v. 78, p.135-163, 2003.

GARCEZ, M.E. et al. Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen. **Fertility and Sterility.**, v. 94, p. 2118-2121, 2010.

GATTI,R. et al. Comparison of Annexin V and Calcein-AM as Early Vital Markers of Apoptosis in Adherent Cells by Confocal Laser Microscopy. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 46, p. 895–900, 1998.

GEHM, B. D. et al. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.**, v. 94, p.14138–14143, 1997.

GINKEL, P. R. V. et al. Resveratrol Inhibits Tumor Growth of Human Neuroblastoma and Mediates Apoptosis by Directly Targeting Mitochondria. **Clinical Cancer Research.**, v. 13, p. 5162-5169, 2007.

GREEN, D. R.; KROEMER, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. **Science**, v. 305, p.626-629, 2004.

HELD, P. An Introduction to Reactive Oxygen Species Measurement of ROS in Cells. **BioTek Instruments**, Inc, 2015.

HUSSEIN, M. R.; HAEMEL, A. K.; WOOD, G. S. Apoptosis and melanoma: molecular mechanisms. **The Journal of Pathology** ., v.199, p. 275–288, 2003.

HUSSEIN, M.R. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. **Human Reproduction Update**, v. 11, p. 162-178, 2005.

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

INA WILLENBERG, I. et al. Development of a Rapid LC-UV Method for the Investigation of Chemical and Metabolic Stability of Resveratrol Oligomers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** , v. 60, p. 7844–7850, 2012.

JAGARLAMUDI, K.; RAJKOVIC, A. Oogenesis: Transcriptional regulators and mouse models. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 356, p. 31-39, 2012.

JIANG, H. et al. Resveratrol-induced apoptotic death in human U251 glioma cells. **Molecular and Cellular Endocrinology** , v. 4, p. 554-561, 2005.

JIANG, X.; WANG, X. Cytochrome c-mediated apoptosis. **Annual Review of Biochemistry** v.73, p.87-106, 2004.

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

JOHNSON, J. et al. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. **Cell**, v. 122, p. 303-315, 2004.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**, 4. ed. Rio de Janeiro: Kookan S.A, 2004. 432p.

KERR, J. B. et al. The primordial follicle reserve is not renewed after chemical or g-irradiation mediated depletion. **Reproduction**, v. 14, p. 3469-3476, 2012.

KEZELE, P.R., et al. Alterations in the ovarian transcriptome during primordial follicle assembly and development. **Biology of Reproduction.**, v. 72, p. 241-255, 2005.

KNIGHT, P. G.; GLISTER, C. TGF- $\beta$  super family members and ovarian follicle development. **Reproduction**, v. 132, p. 191-206, 2006

KOL, S.; ADASHI., E.Y. Intraovarian factors regulating ovarian function. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology.**, v. 7, p. 209-213, 1995.

KONG, X. Resveratrol, an effective regulator of ovarian development and oocyte apoptosis. **Journal of Endocrinological Investigation** v. 34, p.374–381, 2011.

KWAK, S. et al. The effects of resveratrol on porcine oocyte *in vitro* maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and *in vitro* fertilization. **Theriogenology**, v. 78, p. 86–101, 2012.

LEE, K. et al. Effect of resveratrol on the development of porcine embryos produced *in vitro*. **Journal of Reproduction and Development**, v. 56, p.330-335, 2010.

LIMA-VERDE, I.B. et al. Implicações do estresse oxidativo no ovário e no embrião mamífero. *Med. Vet*, v.1, p.81-88, 2007.

LIN, H-Y. et al. IntegrinV $\beta$ 3 contains a receptor site for resveratrol, **The FASEB Journal**, v.20, p.133-136, 2006.

LIU, M. et al. Resveratrol protects against age-associated infertility in mice. **Human Reproduction.**, v.28, p. 707–717, 2013.

LIU, Z.K. et al. Effects of pregnant mare serum gonadotropin (eCG) on follicle development and granulose-cell apoptosis in pig. **Theriogenology**, v. 59, p. 775-785, 2003.

LONG, L.H.; HOI, A.; HALLIWELL, B.; Instability of, and generation of hydrogen peroxide by, phenolic compounds in cell culture media. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 501, p. 162–169, 2010.

LUOH, S.W. et al. Zfx mutation results in small animal size and reduced germ cell number in male and female mice. **Development**, v. 124, p.2275–2284, 1997.

MATOS, M.H.T. et al. Técnicas para avaliação da qualidade de folículos ovarianos pré-antrais cultivados *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal.**, v.31,p. 433-442, 2007.

MITCHELL, S. H.; ZHU, W.; YOUNG, C. Y. F. Resveratrol Inhibits the Expression and Function of the Androgen Receptor in LNCaP Prostate Cancer Cells. **Cancer Research**, v. 59, p. 5892-5895, 1999.

MORITA, Y. et al. Resveratrol promotes expression of SIRT1 and StAR in rat ovarian granulosa cells: an implicative role of SIRT1 in the ovary. **Reproductive Biology and Endocrinology**. v. 23, p. 10:14, 2012.

MUKHERJEE, A. et al. Resveratrol treatment during goat oocytes maturation enhances developmental competence of parthenogenetic and hand-made cloned blastocysts by modulating intracellular glutathione level and embryonic gene expression. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**., v. 31, p. 229–239, 2014.

NERI, S. et al. Calcein-Acetyoxymethyl Cytotoxicity Assay: Standardization of a Method Allowing Additional Analyses on Recovered Effector Cells and Supernatants. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**., v. 8, p. 1131–1135, 2001.

OHINATA, Y. et al.. A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice. **Cell**, v.137, p. 71–584, 2009.

ORTEGA, I. et al.. Effects of resveratrol on growth and function of rat ovarian granulosa cells. **Fertility and Sterility**. v. 98, p. 1563-1573, 2012.

OTSUKA, F. et al.. Bone morpho- genetic protein-15. Identification of target cells and biological functions, **Journal of Biological Chemistry** v. 275, p. 39523–39528, 2000.

OYAWOYE, O. et al. Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome. **Human Reproduction**., v. 18, p. 2270–2274, 2003.

PALMA, G. A. et al. Biology and Biotechnology of Follicle Development. **Science World Journal**., v. 2012, p. 1-14, 2012. doi: 10.1100/2012/938138.

PAN, Z. et al. Current Advances in Epigenetic Modification and Alteration during Mammalian Ovarian Folliculogenesis. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 39, p. 111-123, 2012.

PESCE, M., SCHOLER, H.R. Oct-4: control of totipotency and germline determination. **Molecular Reproduction and Development**., v. 55, p. 452–457, 2000.

PESSOA, A.F.C. **Influência da integridade morfológica folicular, do sistema e da duração do cultivo sobre o desenvolvimento in vitro de folículos pré-antrais caprinos isolados**. 2013. 65 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária- FAVET, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará- UECE, Fortaleza, 2013

PICTON, H.M. et al. The in vitro growth and maturation of follicles. **Reproduction**, v. 136, p. 703-715, 2008.

PLOW, E.F. et al. Ligand Binding to Integrins. **Journal of Biological Chemistry**., v. 275, p. 21785–21788, 2000.

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

ROSSETTO, R. et al. Interaction between ascorbic acid and follicle-stimulating hormone maintains follicular viability after long-term in vitro culture of caprine preantral follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 37, p.112–123, 2009.

ROSSETTO, R. et al. Effect of medium composition on the in vitro culture of bovine pre-antral follicles: morphology and viability do not guarantee functionality. **Zygote**, v. 21, p. 125–128, 2012.

SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1822, p.1896-1912, 2012.

SANTOS J. et al. Immunohistochemical localization of fibroblast growth factor-2 in the sheep ovary and its effects on pre-antral follicle apoptosis and development in vitro. **Reproduction in Domestic Animals**. v.49, p.522-228, 2014.

SANTOS, K. R. P. et al. Análise histológica do ovário de ratas submetidas à ausência de luz. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 10, p. 269-276, 2006.

SHARMA, P.; HUQ, A.U.; SINGH, R. Cypermethrin-induced reproductive toxicity in the rat is prevented by resveratrol. **Journal of Human Reproduction Science**., v.7, p.99-106, 2015.

SIGNORELLI, P.; GHIDONI, R. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. **The Journal of Nutritional Biochemistry.**, v. 16, p. 449- 466, 2005.

SILVA G.M. et al. Papel dos antioxidantes no cultivo in vitro de células ovarianas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal., Belo Horizonte**, v.35, p.315-326, 2011.

SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R.; VAN DEN HURK, R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. **Theriogenology**, v. 71, p. 1193-1208, 2009.

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

SIMSEK, Y. et al. Ameliorative Effects of Resveratrol on Acute Ovarian Toxicity Induced by Total Body Irradiation in Young Adult Rats. **Jornal of Pediatric & Adolescent Gynecology.** v.25, p.262-266, 2012.

SIVAKUMAR, K. K. et al. Prenatal exposure to chromium induces early reproductive senescence by increasing germ cell apoptosis and advancing germ cell cyst breakdown in the F1 offspring. **Developmental Biology.**, v. 388, p. 22-34, 2014.

SOBINOFF, A. P. et al. Scrambled and fried: cigarette smoke exposure causes antral follicle destruction and oocyte dysfunction through oxidative stress. **Toxicology and Applied Pharmacology.**, v. 271, p. 156-167, 2013.

SUBBARAMAIAH, K. et al. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 21875-21882, 1998

SUH, E. K. et al. p63 protects the female germ line during meiotic arrest. **Nature**, v. 444, p. 624-628, 2006.

TALEBI, A. et al. The effect of alpha lipoic acid on the developmental competence of mouse isolated preantral follicles. **Journal of Assisted Reproduction Genetics**, v. 29, p. 175–183, 2012.

THOMAS, F.H., WALTERS, K.A., TELFER, E.E. How to make a good oocyte: an update on in-vitro models to study follicle regulation. **Human Reproduction Update**. v.9, p.541–555, 2003.

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.

UNAL, S.G. et al. The effect of di-n-butyl phthalate on testis and the potential protective effects of resveratrol. **Toxicology and Industrial Health**, p. 1-14, 2013. Doi 10.1177/0748233713512364,

WANG, F. et al. Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**., v. 101, p. 577-586, 2014.

WONG, D.H. et al. Effects of resveratrol on proliferation and apoptosis in rat ovarian theca-interstitial cells. **Molecular Human Reproduction**., Vol.16, No.4 pp. 251–259, 2010.

YIVGI-OHANA, N. et al. Utilizing mitochondrial events as biomarkers for imaging apoptosis. **Cell Death & Disease**., v. 2; p.1-8, 2011.

YULUĞ, E. et al. The short term effects of resveratrol on ischemia–reperfusion injury in rat testis. **Journal of Pediatric Surgery**., v. 49, p. 484-489, 2014.

YUNG, N-C.; LEE, C-H.; SONG, T-Y.; Evaluation of Resveratrol Oxidation *in Vitro* and the Crucial Role of Bicarbonate Ions. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**., v. 74, p. 61-63, 2010.

## **Anexo**

**Effects of Resveratrol on *In Vitro* Development, Apoptosis and Metabolic  
Activity of Ovine Secondary Follicles**

T.J.S. Macedo, V.R.P. Barros, A.P.O. Monte, B.B. Gouveia, M.É.S. Bezerra, A.Y.P.  
Cavalcante, R.S. Barberino, V.G. Menezes, M.H.T. Matos\*

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

Running head: Role of resveratrol on secondary follicle culture

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

## **Contents**

Resveratrol has emerged as a promising natural compound with immense therapeutic potential. It may act as an antioxidant against oxidative stress in different cells, however, resveratrol has never been used in preantral follicle culture. The aim of the present study was to evaluate the effect of resveratrol on viability, apoptosis and development of isolated ovine secondary follicles as well as intracellular glutathione (GSH) level and mitochondrial activity. After collection of the sheep ovaries, secondary follicles were isolated and cultured for 18 days in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> supplemented with BSA, insulin, transferrin, selenium, glutamine, hypoxanthine and ascorbic acid (control medium) or into control medium added by different concentrations of resveratrol (2; 10 or 30  $\mu$ M). The parameters analyzed were morphology, antrum formation, follicular diameter, growth rate, apoptosis, GSH levels and mitochondrial activity. All resveratrol groups significantly decreased the percentage of morphologically normal follicles at day 18 compared with the control group ( $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>). Antrum formation was higher in both  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> and 2  $\mu$ M resveratrol treatments than 10  $\mu$ M resveratrol. In addition, follicles cultured with 30  $\mu$ M resveratrol showed a higher percentage of apoptotic oocytes when compared to control group. Oocytes from follicles treated with 10 and 30  $\mu$ M resveratrol significantly decreased intracellular GSH levels compared with 2  $\mu$ M resveratrol. Moreover,  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> (control) showed more active mitochondria than 10 and 30  $\mu$ M resveratrol. In conclusion, this study showed that resveratrol, at high concentrations,

decreased follicular viability and promoted oocyte apoptosis after *in vitro* culture of ovine secondary follicles, by decreasing GSH levels and metabolic activity.

**Additional keywords:** Preantral, Polyphenol, ROS, Viability, TUNEL

## Introduction

*In vitro* follicle culture is a promising fertility preservation strategy (Hornick et al. 2012), which mimics the process occurring *in vivo*, in order to investigate the underlying physiology and generate a fully grown oocyte able to undergo successful maturation and fertilization (Cecconi 2002). However, *in vitro* cultures of oocytes are maintained at higher oxygen atmosphere than the *in vivo* environment, leading to an increased level of reactive oxygen species (ROS) (Wang et al. 2007). At physiological concentrations, ROS participate in normal cell processes (Chiarugi and Fiaschi 2007; Parker et al. 2011). Increased ROS levels within cells causes cell membrane damage by lipid peroxidation (Dalle-Donne et al. 2006; Deavall et al. 2012), DNA fragmentation (Halliwell and Aruoma 1991; Agarwal et al. 2014) and influences RNA transcription and protein synthesis (Takahashi et al. 2000; Deavall et al. 2012).

*In vivo*, the damaging effects of ROS are usually prevented or limited by endogenous antioxidants, which include enzymes such as glutathione peroxidase (Halliwell 2011). Glutathione (GSH) may play an important role in many biological processes including DNA and protein synthesis, cellular protection during oxidative stress, and cell proliferation during embryonic events (García-Giménez et al. 2013; Timme-Laragy et al. 2013). In addition, a reduced cell stress tolerance could result in altered aerobic metabolism with consequent mitochondrial dysfunction and oxidative

stress (Fabbri et al. 2014). Therefore, glutathione level and metabolic activity are potentially high relevant biochemical marker of the viability and developmental competence of mammalian oocytes (Zuelke et al. 2003; Castaneda et al. 2013). Thus, establishing an *in vitro* culture system with high intracellular levels of GSH and metabolic activity may improve oocyte viability and contribute to the development of assisted reproduction technologies in livestock and human species. However, during *in vitro* culture, the level of natural antioxidants was lower than *in vivo*, consequently, the addition of an antioxidant may be important in order to improve follicle culture results. Resveratrol is a protective substance that can be added to the culture medium of ovarian follicles.

Resveratrol is a natural polyphenol that belongs to the stilbene class and is the common term for 3,5,4V-hydroxystilbene. Resveratrol exists in both trans and cis isomeric forms, however, the trans isomer is by far more commonly found in plants and extensively studied (Signorelli and Ghidoni 2005). Some studies have reported that resveratrol exhibits wide variety of pharmacological properties like cardioprotective, anticancer, anti-inflammatory (Subbaramaiah et al. 1998; Baur and Sinclair 2006; Meng et al. 2014) and antioxidant (Morita et al. 2012) effects. Furthermore, an *in vivo* study showed that pretreatment of irradiated rats with resveratrol protects the ovarian follicle counts and increases the tissue levels of antioxidant enzymes (Simsek et al. 2012). Supplementation of resveratrol at optimum concentration during IVM of swine (Kwak et al. 2012) and caprine (Mukherjee et al. 2014) oocytes stimulated embryonic development by increasing the intracellular GSH and decreasing ROS level. Nevertheless, resveratrol inhibits rat theca-interstitial cell growth by decreasing DNA synthesis and inducing proapoptotic effects (Wong et al. 2010).

There were no reports where the resveratrol has been used as antioxidant agent in *in vitro* culture of ovine preantral follicles. The aim of the present study was to determine if the addition of resveratrol to the culture medium would influence on viability, apoptosis and development of isolated ovine secondary follicles as well as intracellular GSH level and mitochondrial activity.

## **Material and methods**

### *Source of ovaries*

Ovaries (n= 50) were collected at a local abattoir from 10 adult (1 - 3 years old) non-pregnant mixed-breed sheep. Immediately postmortem, 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). The ovaries were transported within one hour to the laboratory in tubes containing MEM-HEPES and antibiotics (100 µg/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin) at 4°C (Chaves et al. 2008). Unless otherwise mentioned, culture media, supplements and chemicals used in the present study were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

### *Isolation and selection of secondary follicles*

In the laboratory, the surrounding fatty tissues and ligaments were stripped from the ovaries. Ovarian cortical slices (1 to 2 mm thick) were cut from the ovarian surface using a surgical blade under sterile conditions and subsequently placed in fragmentation medium consisting of MEM-HEPES with antibiotics. Secondary follicles, approximately 250-400 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 basic culture medium for evaluation of quality. Only secondary 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 45-50 follicles per group.

#### *In vitro culture of secondary follicles*

After selection, the follicles were randomly divided into four study groups and individually cultured (one follicle per droplet) in 100 µl droplets of culture medium under mineral oil in petri dishes (60 x 15 mm, Corning, USA). The basic control medium was consisted of  $\alpha$ -MEM (pH 7.2 - 7.4) supplemented with 3.0 mg/ml bovine serum albumin (BSA), 10 ng/ml insulin, 5.5 µg/ml transferrin, 5.0 ng/ml selenium, 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine and 50 µg/ml ascorbic acid and then referred as  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>. For the experimental conditions, the control medium was supplemented with resveratrol at different concentrations (2; 10 or 30 µM). All follicles were cultured at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> for up to 18 days. Every 2 days, 60 µl of the culture media was replaced with fresh media in each droplet.

#### *Morphological evaluation of follicle development*

During and after culture, follicles were classified according to their morphological characteristics, and those showing morphological signs of degeneration, such as darkness of the oocytes and the surrounding granulosa cells, misshapen oocytes,

rupture of the basement membrane and/or oocyte extrusion were classified as degenerated. Analysis of follicular morphology was performed every six days of culture.

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, and (iii) the growth rate, calculated as the diameter variation during the culture period.

After 18 days of culture, all of the healthy follicles were carefully and mechanically opened with 26 G needles under a stereomicroscope for oocyte recover. The recovery percentage of oocytes was calculated as the number of acceptable quality oocytes ( $\geq 110 \mu\text{m}$ ) recovered out of the total number of cultured follicles.

#### *Assessment of apoptosis by TUNEL assay*

To assess DNA fragmentation and apoptosis, at the end of culture, oocytes were subjected to the TUNEL assay as previously described (Li et al, 2009). Briefly, after *in vitro* culture, oocytes were fixed in 4% paraformaldehyde solution for 1 h at room temperature. Oocytes were washed three times in PBS/PVP and stored at 4 °C in eppendorf with 400  $\mu\text{l}$  of PBS-PVP until the beginning of TUNEL procedure. For the TUNEL assay, oocytes were incubated in droplets of 100  $\mu\text{l}$  of permeabilizing solution [0.1% (v/v) Triton X-100 in 10 mM PBS] for 3 h at room temperature. Positive and negative controls were incubated in drops of 100  $\mu\text{l}$  containing DNase free RNase (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) at 37 °C for 1 h and washed 3

times in 50  $\mu$ L drops of PBS-PVP. The TUNEL assay was prepared about 15 minutes prior to use and kept on as indicated by the manufacturer 4 °C (In Situ Cell Detection Kit, Fluorescein: Boehringer Mannheim/Roche Diagnostics). To this end, 12.5  $\mu$ L DTT enzyme and 112.5  $\mu$ l of marker solution of 2-deoxyuridine triphosphate 5-FITC - FITC-dUTP were made to obtain 125  $\mu$ l of TUNEL mixture for reaction. The experimental groups and the positive control were incubated with 15  $\mu$ l of this solution for 1 hour at 37 °C in a moist chamber in the dark. The negative control was incubated at 15  $\mu$ l with the marker solution. Oocytes were washed 3 times in 50  $\mu$ l drops of PBS-PVP and incubated in drops of 50  $\mu$ l containing 5  $\mu$ l/ml Hoechst 33342 in 10 mM PBS for 15 minutes at room temperature in the dark. Oocytes were washed 3 times in 50  $\mu$ l drops of PBS-PVP and slides were prepared for evaluation using an epifluorescence microscope (Nikon E200, Tokyo, Japan) at a magnification of x400.

#### *Measurement of GSH levels*

After 18 days of culture, the oocytes were recovered to determine intracellular GSH levels, which were measured as previously described (Keere et al. 2013), with minor modifications. Briefly, 4-chloromethyl-6.8-difluoro-7-hydroxycoumarin (CellTracker Blue; CMF2HC; Invitrogen) was used to detect intracellular GSH level as blue fluorescence. Six to eight oocytes from each group were incubated (in the dark) for 30 minutes in PBS supplemented with 10 mM of CellTracker. After incubation, the oocytes were washed with PBS and the fluorescence was observed under an epifluorescence microscope with UV filter (370 nm for GSH). Fluorescent images were saved as image TIFF format. The fluorescence intensities of oocytes were analyzed using Image J software (Version 1.47; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) and normalized to those of the control oocytes.

### *Evaluation of mitochondrial activity*

After *in vitro* culture, the oocytes were recovered, denuded and stained for active mitochondria as previously described (Fabbri et al. 2014), with minor modifications. Briefly, oocytes were incubated in PBS with 100 nM Mitotracker Red (Mitotracker® Red, CMXRos, Molecular Probes, Melbourne, Victoria, Australia) at 37 °C. After incubation with the mitochondria specific probe, oocytes were washed in PBS and evaluated using an epifluorescence microscope at a magnification of x400. Fluorescent images were saved as image TIFF format and fluorescence intensity of the oocytes was measured using the Image J software (NIH, Bethesda, MD, USA).

### *Statistical analysis*

Data from follicle survival, extruded follicles, antrum formation and retrieval of grown oocytes after *in vitro* culture were expressed as percentages and compared by the Chi-squared test. Data from GSH, mitochondrial activity, follicular diameter and growth rates were submitted to the Shapiro-Wilk test to verify normal distribution of residues and homogeneity of variances. Then, Kruskal-Wallis non-parametric test was used for comparisons. When main effects or interactions were significant, means were compared by test Student Newman Keuls. Data from apoptotic cells (TUNEL) were submitted to PLSD Fisher test and expressed as percentage. 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. 1A). As early as day 6 of the culture, a small antral cavity (Fig. 1B), atretic (Fig. 1C) and extruded (Fig. 1D) follicles could be observed in all the treatments. The percentage of morphologically normal follicles after *in vitro* culture is shown in Figure 2. From day 0 to day 18, there was a reduction ( $p < 0.05$ ) in the percentage of morphological normal follicles in all treatments. Considering the same culture period, the percentages of normal follicles were similar ( $p > 0.05$ ) among control and resveratrol treatments at day 12 of culture. However, all resveratrol treatment groups significantly decreased the follicular survival at day 18 in comparison with the control group ( $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>).

From day 6 of culture onward, antral cavity formation was observed in all treatments (Fig. 3). At the end of culture, antrum formation was higher in both  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> and 2  $\mu$ M resveratrol treatments than 10  $\mu$ M resveratrol ( $p < 0.05$ ). There were no significant differences ( $p > 0.05$ ) in follicular diameter, in the daily growth rate or in the percentage of oocytes larger than 100  $\mu$ m at the end of culture among treatments (data not shown).

#### *Oocyte apoptosis detection by TUNEL assay*

The TUNEL assay revealed the presence of apoptotic oocytes in all treatments after 18 days of culture. Control group ( $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>) consists mainly of healthy oocytes (Fig. 4A). However, follicles cultured with 30  $\mu$ M resveratrol showed a significantly higher percentage (62.5%) of apoptotic oocytes (Fig. 4B) when compared to control group (14.3%) (Fig. 5). No differences on TUNEL-positive oocytes were observed among  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>, 2 or 10  $\mu$ M resveratrol ( $p > 0.05$ ).

### *Effects of resveratrol on intracellular GSH levels and mitochondrial activity*

Oocytes from follicles treated with 10 and 30  $\mu\text{M}$  resveratrol significantly decreased ( $p < 0.05$ ) intracellular GSH levels compared with 2  $\mu\text{M}$  resveratrol (Fig. 6). Moreover, the control group ( $\alpha\text{-MEM}^+$ ) showed more active mitochondria than 10 and 30  $\mu\text{M}$  resveratrol groups (Fig. 6).

### **Discussion**

To our knowledge, this study is the first report evaluating the effects of resveratrol on the culture of isolated ovarian preantral follicles. The present study demonstrates that under the tested conditions resveratrol negatively affects sheep follicular survival and development by: (i) increasing apoptosis, (ii) decreasing GSH levels and (iii) reducing metabolic activity.

Over the past decade, resveratrol has emerged as a very promising natural compound with immense therapeutic potential (Wong et al. 2010). It is found in high concentrations in grapes, berries, nuts and red wine with potentially beneficial anti-carcinogenic, anti-inflammatory, antioxidant and cardioprotective properties (Jiang et al. 2005). Recent studies have reported that resveratrol may act as an antioxidant against oxidative stress in different types of cells (oocytes: Kwak et al. 2012; spermatozoa: Ünal et al. 2013; kidney cells: Valentovic et al. 2014). However, in our *in vitro* culture system, the percentage of morphologically normal follicles was lower in medium containing resveratrol (2, 10 or 30  $\mu\text{M}$ ) and apoptosis rate was higher at 30  $\mu\text{M}$  resveratrol compared with the control group ( $\alpha\text{-MEM}^+$ ). After rat theca-interstitial cell culture, Wong et al. (2010) also observed that resveratrol reduced the viable cell number at highest concentrations (70 and 100  $\mu\text{M}$ ) as well as induced a dose-dependent increase in caspase-3/7 activation and DNA fragmentation at

concentrations of 50 and 100  $\mu\text{M}$ . In their study, 30  $\mu\text{M}$  resveratrol did not increase cellular apoptosis. Resveratrol can modulate the activity of many key mediators of cell cycle and survival. Therefore, resveratrol may participate in both prosurvival and prodeath cellular mechanisms, favoring the preservation of the functional status of cells and possibly elongating a cell life span, and inducing the death of cells whose physiological conditions have become deranged (Signorelli and Ghidoni 2005).

Studies showed that resveratrol can bind to cell surface proteins, such as integrin, promoting apoptosis. The integrins are heterodimeric structural plasma membrane glycoproteins whose extracellular domains bind to matrix proteins and other extracellular factors (Plow et al. 2000). Resveratrol binds to the integrin intracellular domain  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ , activates the extracellular regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) pathway with consequent phosphorylation of serine-15-p53, resulting in cancer cell apoptosis (Lin et al. 2003). Since integrin mRNA expression has been described previously in the mouse ovary (Burns et al. 2002), it is likely that resveratrol may bind to this protein to promote apoptosis. Another possibility is that after autooxidation or degradation, resveratrol could generate complexes with others molecules, such as copper ions. Indeed, the oxidative product of resveratrol is a dimer, and the initial electron transfer generates the reduction of Cu(II) to Cu(I). Thus, the copper peroxide complex is able to bind DNA and to form a DNA-resveratrol-Cu(II) ternary complex (Hadi et al. 2010). These complexes would favor and give rise to internucleosomal DNA fragmentation, which is a hallmark of apoptosis (Delmas et al. 2011). However, in the current study, it is not clear by which mechanism resveratrol promotes apoptosis.

Failure of antioxidant defense mechanisms to counteract oxidative stress allows ROS to alter the cellular redox (reduction-oxidation) state, with decreased total

antioxidant capacity in follicles accompanied by poor oocyte fertilization. The damaging effects of ROS are usually prevented or limited by endogenous antioxidants (or scavengers of free radicals) (Oyawoye et al. 2003). Some studies have demonstrated that resveratrol exerts its antioxidant effects by modulation of antioxidant enzymes, such as GSH, thus decreasing ROS levels (Simsek et al. 2012; Kwak et al. 2012; Mukherjee et al. 2014). However, in the present study, resveratrol at 10 or 30  $\mu\text{M}$  reduced intracellular GSH levels compared with the lowest concentration (2  $\mu\text{M}$ ). We can hypothesize that resveratrol may act as pro-oxidant agent at high concentrations, reducing antioxidant enzyme levels, probably increasing ROS production, thus promoting apoptosis in the ovine oocytes. In addition, besides the species-specific differences, resveratrol can work as a pro-oxidant as well as an anti-oxidant agent depending on the concentration administered to the cells and on the cell types (Delmas et al. 2011).

The mitochondria, the most abundant organelles in mammalian oocytes, play a primary role during cytoplasmic maturation (Harris et al. 2010). Oxidative stress causes mitochondria damage, leading to mitochondrial dysfunction (Tanabe et al. 2015). Evaluation of tissue metabolism provides an indication of normal mitochondrial bioenergetic activities, including adenosine triphosphate generation, calcium homeostasis, signal transduction, regulation of cytoplasmic redox status, and thus ROS production. Therefore, these parameters (GSH and active mitochondria) were chosen as both are considered to be related to the fertilizing potential and developmental capacity of oocytes (McEvoy et al. 2000; Cummins 2004; Castaneda et al. 2013). In our culture system, the highest concentrations of resveratrol (10 and 30  $\mu\text{M}$ ) reduced mitochondrial activity. One mechanism of resveratrol antiproliferative activity is the activation of the intrinsic apoptotic pathway, the

mitochondrial release of cytochrome c and the involvement of Bax, the generation of ROS, the modulation of p53 pathway and the activation of the extrinsic death receptor pathway (Delmas et al. 2011). Specifically, resveratrol interferes with the mitochondrial respiratory chain, and leads to the increase of ROS production (Wallace 1999). The redox state of the cells plays a role in many types of apoptosis and the ROS produced at the level of the mitochondria can be involved in cell death (Mignotte and Vayssiere 1998).

In the current study, antrum formation was higher in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> and 2  $\mu$ M resveratrol treatments than 10  $\mu$ M resveratrol, however, no effect on follicular growth was observed. After antrum formation, the follicle begins dependent on FSH (Erickson and Shimasaki 2001), suggesting that the use of FSH in the basic culture medium may be necessary to give a large support to antral follicle growth. Nevertheless, supplementation of resveratrol (0.24 and 0.5  $\mu$ M) during IVM of goat oocytes improved embryonic developmental potential (Mukherjee et al. 2014), thus showing that at optimum concentration, resveratrol may be important for oocyte growth. Therefore we believe that resveratrol at concentrations lower than 2  $\mu$ M may be ideal for providing ovine secondary follicle development.

In conclusion, high concentrations of resveratrol decreased follicular viability and promoted oocyte apoptosis after *in vitro* culture of ovine secondary follicles, by decreasing GSH levels and metabolic activity. As resveratrol may represent a novel therapeutic agent and has dose and cell-dependent effects, future studies should be done to investigate the suitable concentration for culture medium supplementation.

## **Acknowledgments**

This work was supported by FACEPE (Process APQ-1853-5.05/12). T.J.S. Macedo receives a scholarship from the FACEPE. M.H.T. Matos is supported by a grant from CNPq.

## **Conflict of interest**

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

## **References**

- Agarwal A, Mulgund A, Alshahrani S, Assidi M, Abuzenadah AM, Sharma R, Sabanegh E, 2014: Reactive oxygen species and sperm DNA damage in infertile men presenting with low level leukocytospermia. *Reprod Biol Endocrinol* 12, 1-8.
- Burns K.H.; Owens G.E.; Fernandez J.M.; Nilson J.H.; Matzuk M.M, 2002: Characterization of Integrin Expression in the Mouse Ovary. *Biol of Reprod* 67, 743–751.
- Baur JA, Sinclair DA, 2006: Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 5, 493-506.
- Castaneda CA, Kaye P, Pantaleon M, Phillips N, Fry R, D’Occhio MJ, 2013: Circulating concentrations of leptin, ovarian follicle number, and oocyte lipid content and active mitochondria, in Zebu crossbred cows maintained on standard or improved nutrition. *Anim Reprod Sci* 140, 7–13.
- Cecconi S, 2002: Growth and differentiation of small ovarian follicles in mammals: problems and future perspectives. *J Reprod Dev* 48, 431-445.

- Chaves RN, Martins FS, Saraiva MVA, Celestino JJH, Lopes CAP, Correia JC, Lima-Verde IB, Matos MHT, Bao SN, Name KPO, Campello CC, Silva JRV, Figueiredo JR, 2008: Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured in vitro. *Reprod Fertil Dev* 20, 640–647.
- Chiarugi P, Fiaschi T, 2007: Redox signalling in anchorage-dependent cell growth. *Cell Signal* 19, 672–682.
- Cummins JM, Jequier AM, Kan R, 1994: Molecular biology of the human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics and oxidative stress. *Mol Reprod* 37, 345-362.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A, 2006: Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 52, 601–623.
- Deavall DG, Martin EA, Horner JM, Roberts R, 2012: Druginduced oxidative stress and toxicity. *J Toxicol* 2012, 1-13.
- Delmas D, Aires V, Dutartre P, Mazué F, Ghiringhelli F, Latruffe N, 2011: Transport, stability, and biological activity of resveratrol. *Ann NY Acad Sci* 1215, 48-59.
- Erickson GF, Shimasaki S, 2001: The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. *Fertil Steril* 76, 5.
- Fabbri, R.; Vicenti, R.; Martino, N.A.; Dell'Aquila, M.E.; Pasquinelli, G.; Macciocca, M.; Magnani, V.; Paradisi, R.; Venturoli,S, 2014: Confocal laser scanning microscopy analysis of bioenergetic potential and oxidative stress in fresh and frozen-thawed human ovarian tissue from oncologic patients. *Fertil Steril* 101, 195-804.

- García-Giménez JL, Markovic J, Dasí F, Queval G, Schnaubelt D, Foyer CH, Pallardó FV, 2013: Nuclear glutathione. *Biochim Biophys Acta* 1830, 3304–3316.
- Hadi SM, Ullah MF, Azmi AS, Ahmad A, Shamim U, Zubair H, Khan HY, 2010: Resveratrol Mobilizes Endogenous Copper in Human Peripheral Lymphocytes Leading to Oxidative DNA Breakage: A Putative Mechanism for Chemoprevention of Cancer. *Pharm Res* 27, 979–988.
- Halliwell B, Aruoma OI, 1991: DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* 281, 9–19.
- Halliwell B, 2011: Free radicals and antioxidants - quo vadis? *Trends Pharmacol Sci* 32, 125–130.
- Harris SE, Maruthini D, Tang T, Balen AH, Picton HM, 2010: Metabolism and karyotype analysis of oocytes from patients with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 25, 2305–2315.
- Hornick JE, Duncan FE, Shea LD, Woodruff TK, 2012: Isolated primate primordial follicles require a rigid physical environment to survive and grow in vitro. *Hum Reprod* 27, 1801-1810.
- Jiang H, Zhang L, Kuo J, Kuo K, Gautam SC, Groc L, Rodriguez AI, Koubi D, Hunter TJ, Corcoran GB, Seidman MD, Levine RA, 2005: Resveratrol-induced apoptotic death in human U251 glioma cells. *Mol Cancer Ther* 4, 554-561.
- Kerr JB, Hutt KJ, Michalak EM, Cook M, Vandenberg CJ, Liew SH, Bouillet P, Mills A, Scott CL, Findlay JK, Strasser A, 2012: The primordial follicle reserve is not renewed after chemical or g-irradiation mediated depletion. *Reproduction* 14, 3469-3476.

- Li HJ, Liu DJ, Cang M, Wang LM, Jin MZ, Ma YZ, Shorgan B, 2009: Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocytes. *Animal Reproduction Science* 114, 89–98
- Lin H-Y.; Lansing L.; Merillon J-M.; Davis F.B.; Tang H-Y.; Shih A.; Vitrac X.; Krisa S.; Keating T.; Cao H.J.; Bergh J; Quackenbush, S.; Davis P.J, 2006. Integrin  $\alpha$ V $\beta$ 3 contains a receptor site for resveratrol, *The FASEB Journal* 20, 133-136.
- Kwak SS, Cheong SA, Jeon Y, Lee E, Choi KC, Jeung EB, Hyun SH, 2012: The effects of resveratrol on porcine oocyte in vitro maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and in vitro fertilization. *Theriogenology* 78, 86–101.
- McEvoy TG, Coull GD, Broadbent PJ, Hutchinson JS, Speake BK, 2000: Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *J. Reprod. Fertil.* 118, 163–170.
- Meng Y, Xu Z, Wu F, Chen W, Xie S, Liu J, Huang X, Zhou Y, 2014: Sphingosine-1 phosphate suppresses cyclophosphamide induced follicle apoptosis in human fetal ovarian xenografts in nude mice. *Reproductive Science* 102, 871-877.
- Mignotte B, Vayssier JL, 1998: Mitochondria and apoptosis. *Eur. J. Biochem* 252, 1-15.
- Morita Y, Wada-Hiraike O, Yano T, Shirane A, Hirano M, Hiraike H, Koyama S, Oishi H, Yoshino O, Miyamoto Y, Sone K, Oda K, Nakagawa S, Tsutsui K, Taketani Y, 2012: Resveratrol promotes expression of SIRT1 and StAR in rat ovarian granulosa cells: an implicative role of SIRT1 in the ovary. *Reprod Biol Endocrinol* 23, 10-14.

- Mukherjee A.; Malik H.; Saha A.P.; Dubey A.; Singhal D.K.; Boateng S.; Saugandhika, S.;Kumar S.; De S.; Guha S.K.; Malakar D, 2014. Resveratrol treatment during goat oocytes maturation enhances developmental competence of parthenogenetic and hand-made cloned blastocysts by modulating intracellular glutathione level and embryonic gene expression. *J Assist Reprod Genet* 31, 229–239.
- Oyawoye O, Abdel GA, Constantinovic N, Perret C, Hardiman P, 2003: Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome. *Hum Reprod* 18, 2270–2274.
- Park SG, Kim JH, Xia Y, Sung JH, 2011: Generation of reactive oxygen species in adipose-derived stem cells: friend or foe? *Expert Opin Ther Targets* 15, 1297-306.
- Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith, JW, 2000: Ligand Binding to Integrins. *The Journal of Biol Chemistry* 275, 21785–21788.
- Signorelli P, Ghidoni R, 2005: Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *J Nutr Biochem* 16, 449- 466.
- Simsek Y, Gurocak S, Turkoz Y, Akpolat N, Celik O, Ozer A, Yilmaz E, Turhan U, Ozyalin F, 2012. Ameliorative Effects of Resveratrol on Acute Ovarian Toxicity Induced by Total Body Irradiation in Young Adult Rats. *J of Ped and Adol Gynecol* 25, 262–266.
- Takahashi M, Keicho K, Takahashi H, Ogawa H, Schultz RM, Okano A, 2000: Effect of oxidative stress on development and DNA damage in in-vitro cultured bovine embryos by comet assay. *Theriogenology* 54, 137– 45.
- Tanabe M, Tamura H, Taketani T, Okada M, Lee L, Tamura I, Maekawa R, Asada H, Ymagata Y, Sugino N, 2015: Melatonin protects the integrity of granulosa cells

by reducing oxidative stress in nuclei, mitochondria, and plasm membranes in mice. *J Reprod Dev* 61, 35-41.

Timme-Laragy AR, Goldstone JV, Imhoff BR, Stegeman JJ, Hahn ME, Hansen JM, 2013: Glutathione redox dynamics and expression of glutathione-related genes in the developing embryo. *Free Rad Biol Med* 65, 89–101.

Unal SG, Take G, Erdogʻan D, Goktas G, Sahin E, 2013: The effect of di-n-butyl phthalate on testis and the potential protective effects of resveratrol. *Toxicol Ind Health*, 1-15.

Valentovica M, Ball JG, Brown, JM, Terneus, MV, McQuade E, Van Meter S, Hedrick MH, Roy AA, Williams T, 2013: Resveratrol attenuates cisplatin renal cortical cytotoxicity by modifying oxidative stress. *Toxicology in Vitro* 28, 248-257.

Wallace DC, 1999: Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283, 1482–1488.

Wang F, Tian X, Zhang L, He C, Li Y, Tan D, Liu G, 2014: Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 101, 577-586.

Wong DH, Villanueva JA, Cress AB, Duleba AJ, 2010: Effects of resveratrol on proliferation and apoptosis in rat ovarian theca-interstitial cells. *Mol Hum Reprod* 16, 251–9.

Zuelke KA, Jeffay SC, Zucker RM, Perreault SD, 2003: Glutathione (GSH) concentrations vary with the cell cycle in maturing hamster oocytes, zygotes, and pre-implantation stage embryos. *Mol Reprod Dev* 64, 106–112.

## Figure captions

**Figure 1.** Morphologically normal secondary follicle at day 0 (A); antral follicle after 6 days culture in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> (B); atretic (C) and extruded (D) follicle after 6 days of culture in 30  $\mu$ M resveratrol. O: oocyte; GC: granulosa cell; Arrow: antral cavity. Scale bars: 200  $\mu$ m.

**Figure 2.** Percentages of morphologically normal follicles cultured in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> or different concentrations of Resveratrol (RSV 2; 10 or 30  $\mu$ M).

(<sup>a,b</sup>) Different letters denote significant differences among culture periods in the same treatment ( $P < 0.05$ ). (<sup>A,B</sup>) Different letters denote significant differences among treatments in the same period ( $p < 0.05$ ).

**Figure 3.** Percentages of antral cavity formation in follicles cultured in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> or different concentrations of Resveratrol (RSV 2; 10 or 30  $\mu$ M).

(<sup>a,b</sup>) Different letters denote significant differences among culture periods in the same treatment ( $P < 0.05$ ). (<sup>A,B</sup>) Different letters denote significant differences among treatments in the same period ( $p < 0.05$ ).

**Figure 4.** Identification of oocyte apoptosis after 18 days of in vitro culture by TUNEL. (A) Normal oocyte from control group and (B) TUNEL-positive oocytes (cells in green) from 30  $\mu$ M resveratrol treatment group.

**Figure 5.** Percentage (mean  $\pm$  SEM) of TUNEL-positive oocytes after 18 days of culture in different concentrations of resveratrol.

<sup>(A,B)</sup> Different letters denote significant differences between treatments ( $p < 0.05$ ).

**Figure 6.** Epifluorescent photomicrographic images of in vitro cultured ovine oocytes. (a) Oocytes were stained with CellTracker Blue (A–D) and MitoTracker red (E–H) to detect intracellular levels of glutathione (GSH) and mitochondrial activity, respectively. Oocytes cultured in control group (A and E) or with 2.0 (B and F), 10.0 (C and G) or 30  $\mu\text{M}$  (D and H) resveratrol. Scale bars: 50  $\mu\text{m}$ . (b) Effect of resveratrol treatment in in vitro culture medium on intracellular GSH and active mitochondria levels in sheep oocytes. Within each group (GSH and Active Mitochondria) of end point, bars with different letters (A–C) are significantly different ( $p < 0.05$ ).