



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

Thae Lanne Barbosa Gama Lins

EFEITO DA RUTINA SOBRE O DESENVOLVIMENTO *IN*
***VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIIS ISOLADOS**
OVINOS

PETROLINA

2016

THAE LANNE BARBOSA GAMA LINS

**EFEITO DA RUTINA SOBRE O DESENVOLVIMENTO *IN*
VITRO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS ISOLADOS
OVINOS**

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

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

PETROLINA

2016

L759e Lins, Thae Lanne Barbosa Gama
Efeito da rotina sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais isolados ovinos / Thae Lanne Barbosa Gama Lins. – Petrolina, 2016.
xiv; 92 f. : il. ; 29 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, Petrolina-PE, 2016.

Orientadora: profª. Drª. Maria Helena Tavares de Matos.

Referências.

1. Ovinos. 2. Reprodução animal. I. Título. II. Matos, Maria Helena Tavares de. III Universidade Federal do Vale do São Francisco.

CDD 636.0824

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

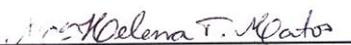
Thae Lanne Barbosa Gama Lins

EFEITO DA RUTINA SOBRE O DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE
FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS ISOLADOS OVINOS

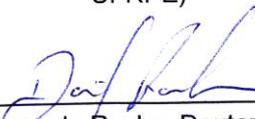
Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias no Semiárido, pela Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Aprovada em: 29 de julho de 2016.

Banca Examinadora


(Maria Helena Tavares de Matos, Doutora, UNIVASF)


(Aurea Wischral, Doutora, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE)


(David Ramos da Rocha, Doutor, UNIVASF)

AGRADECIMENTOS

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

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

Ao meu pai Urbano Gomes Lins, pela sua dedicação nestes últimos anos.

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

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

Aos meus avôs Ildete Gomes Lins e Félix Lopes Lins, pelo imenso amor, amparo e carinho.

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

A toda a minha família, pela sua cumplicidade, preocupação, incentivo, comemorações. Pela sua existência dando uma razão pra minha vida.

Ao grupo de pesquisa Biotecnologia Aplicada ao Desenvolvimento de Folículos Ovarianos (BIOFOV): Agnes Yasmin Cavalcante, Alane Pains, Bruna Bortoloni, Éllida Bezerra, Jamile Santos, Lara Rios, Melissa Müller, Ricássio Barberino, Taís Jobard, Vanessa Barros, Vanúzia Menezes, e Victória Correia pelo imenso apoio, parceria e amizade compartilhados.

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

À Universidade Federal do Vale do São Francisco, que através de sua estrutura educadora (professores, secretários, técnicos e coordenadores), contribuiu para minha formação profissional.

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

Aos componentes da banca, pela contribuição para a conclusão do curso.

“O temor do Senhor é a instrução da sabedoria, e diante
da honra vai a humildade”

RESUMO

A rutina é um flavonoide e seu potencial antioxidante já foi demonstrado em diferentes tipos celulares. Entretanto, ainda não há informações sobre o efeito antioxidante da rutina no cultivo *in vitro* de folículos secundários ovinos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da rutina como único suplemento antioxidante, adicionado ao meio de base, sobre o cultivo *in vitro* de folículos secundários isolados de ovários ovinos. Folículos secundários (n= 55-61) ovinos, com diâmetro em torno de 200 µm, foram cultivados individualmente em gotas de 100 µL, durante 12 dias, à 39°C, em α-Meio Essencial Mínimo (α-MEM) suplementado com 3,0 mg/mL BSA, 10 ng/mL insulina, 2 mM glutamina e 2 mM hipoxantina (meio livre de antioxidantes, denominado de α-MEM) ou neste mesmo meio adicionado ainda de 5,5 µg/mL transferrina, 5,0 ng/mL selênio e 50 µg/mL ácido ascórbico (AO). Para avaliar o efeito antioxidante da rutina, aos diferentes meios de base, com ou sem antioxidantes (α-MEM ou AO), foram adicionados diferentes concentrações de rutina (0,1; 1 ou 10 µg). A cada 6 dias, os folículos foram avaliados quanto aos aspectos morfológicos (folículos normais, formação de antro e diâmetro folicular). Ao final do cultivo, determinou-se a porcentagem de oócitos totalmente crescidos (oócitos >110 µm). Nos tratamentos que obtiveram os melhores resultados de morfologia, foram avaliados a viabilidade folicular, através dos marcadores fluorescentes calceína-AM e etídio-homodímero 1, apoptose folicular através da técnica de TUNEL e os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (EROs), glutathiona (GSH) e mitocôndrias ativas. As taxas de folículos normais, formação de antro, viabilidade e oócitos >110 µm foram comparadas pelo Qui-quadrado. Os dados de diâmetro folicular, taxa de crescimento, foram submetidos ao Shapiro-Wilk seguido do teste de Kruskal-Wallis; e comparados pelo Student Newman Keuls. A apoptose foi avaliada pelo teste de Fisher. Níveis de EROs, GSH e mitocôndrias ativas foram submetidos a ANOVA (P<0,05). Os resultados mostraram que após 12 dias de cultivo, os meios AO e α-MEM (sem antioxidante) acrescido de 0,1 µg de rutina apresentaram porcentagens de folículos normais superiores (p<0,05) quando comparados aos demais tratamentos. Não houve diferenças (p>0,05) no diâmetro e na taxa de crescimento. Além disso, AO e α-MEM acrescido de 0,1 µg de rutina apresentaram porcentagem de viabilidade folicular, formação de antro, oócitos totalmente crescidos, níveis de EROs e mitocôndrias ativas semelhantes (p>0,05). No entanto, o tratamento α-MEM adicionado de 0,1 µg de rutina apresentou níveis de GSH superiores quando comparado ao AO. Em conclusão, na concentração de 0,1 µg, a rutina pode ser utilizada como o único antioxidante presente no meio de base para o cultivo *in vitro* de folículos secundários ovinos, mantendo a viabilidade folicular e aumentando os níveis de GSH.

Palavras-chave: Flavonoide. Oócito. Ovino. GSH. Sobrevivência.

ABSTRACT

Rutin is a flavonoid that acts as a potent antioxidant in different cells types. However, there is no information about the effect of the antioxidant rutin on the in vitro culture of ovine secondary follicles. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of rutin as the only antioxidant added to the base medium on the in vitro culture of ovine isolated secondary follicles. Sheep secondary follicles (n= 55-61), approximately 200 μm , were individually cultured in 100 μL drops, during 12 days, at 39°C, in α -Minimal Essential Medium (α -MEM) supplemented with 3.0 mg/mL BSA, 10 ng/mL insulin, 2 mM glutamine and 2 mM hypoxanthine (antioxidant free-medium, called α -MEM) or in this medium also added by 5.5 $\mu\text{g/mL}$ transferrin, 5.0 ng/mL selenium and 50 $\mu\text{g/mL}$ ascorbic acid (AO). To evaluate the effect of rutin, different concentrations of this antioxidant (0,1; 1 ou 10 μM) were added to the different base media, with or without antioxidant (α -MEM or AO). At each 6 days, morphological aspects were analyzed (normal follicles, antrum formation and follicular diameter). At the end of culture, the percentage of fully-grown oocytes (oocytes >110 μm) was evaluated. In treatments that had the best results of morphology, other parameters were analyzed, such as follicular viability through the fluorescent markers calcein-AM and ethidium homodimer 1, and intracellular levels of reactive oxygen species (ROS), glutathione (GSH) and active mitochondria. The rates of normal follicles, antrum formation, viability and oocytes >110 μm were compared by Qui-square test. Data from follicular diameter, growth rate, levels were submitted to Shapiro-Wilk followed by Kruskal-Wallis; and compared by Student Newman Keuls. Apoptosis was evaluated by Fisher's test. ROS levels, GSH and active mitochondria were subjected to ANOVA ($P<0.05$). The results showed that after 12 days of culture, AO and α -MEM (without antioxidant) added by 0,1 μM rutin had higher percentages of normal follicles ($p<0.05$) than other treatments. There is no difference ($p>0.05$) in the diameter and growth rate. Moreover, AO and α -MEM added by 0,1 μM rutin showed similar ($p>0.05$) percentages of follicular viability, antrum formation, fully-grown oocytes, levels of ROS and active mitochondria. However, treatment α -MEM added by 0,1 μM rutin showed higher GSH levels than AO . In conclusion, at a concentration of 0,1 μM , rutin can be used as the only antioxidant present in base medium for in vitro culture of ovine secondary follicles, maintaining follicular viability and increasing GSH levels.

Key-words: Flavonoid. Oocyte. Ovine. GSH. Survival.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1** - Desenho esquemático do ovário mamífero, destacando os folículos ovarianos em diferentes estádios de desenvolvimento. Fonte: GONÇALVES, 2012. 15
- Figura 2** - Representação esquemática dos processos de oogênese e foliculogênese. Fonte: Modificado de VAN DEN HURK; ZHAO, 2005. 17
- Figura 3** - Fatores que controlam a ativação, crescimento e sobrevivência de folículos primordiais. Fonte: Modificado de SILVA et al., 2016. 19
- Figura 4** - Representação esquemática das vias celulares, extrínseca e intrínseca, do processo apoptótico. Fonte: LIMA et al., 2011. 24
- Figura 5** - Estrutura química da rutina. Os grupamentos hidroxila em destaque são responsáveis pelo sequestro direto de EROs. Fonte: PIETTA, 2000; OLIVEIRA et al., 2015. 32
- Figura 6** - Imagens fluorescentes para calceína-AM (A) e etídeo homodímero 1 (B). Fonte: arquivo pessoal. 34
- Figura 7** - Imagens fluorescentes para CellTracker® Blue (A), H₂DCFDA (B) e Mitotracker® Red (C). Fonte: arquivo pessoal. 35
- Figura 8** - Imagens fluorescentes demonstrando oócito com marcação para TUNEL (A) e Hoescht 33342 (B). Setas indicam a marcação fluorescente na cromatina. Fonte: arquivo pessoal. 36

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Protocolo experimental para o cultivo in vitro de folículos secundários ovinos em diferentes meios.

45

Figura 2 - Folículo secundário morfologicamente normal no dia 12 (A); folículos antrais após 6 dias de cultivo em α -MEM + RT 0,1 (B); atrésico (C) e folículos extrusos após 6 dias de cultura na AO + RT 1 (D). GC: células da granulosa; O: oócito. A seta indica a cavidade antral. Barra de escala: 100 μ m. α -MEM: meio sem antioxidantes e AO: α -MEM contendo antioxidantes e RT: rutina.

49

Figura 3 - Percentagens de folículos morfologicamente normais cultivados em diferentes meios adicionados ou não de diferentes concentrações de rutina. (a, b, c) Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo período ($P < 0,05$); (A, B, C) Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os períodos da cultivo no mesmo tratamento ($P < 0,05$). α -MEM: meio sem antioxidantes ; AO: α -MEM contendo antioxidantes e RT: rutina.

50

Figura 4 - Percentagens de formação de antro em folículos cultivados em diferentes meios adicionados ou não de diferentes concentrações de rutina. (a, b, c) Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo período ($P < 0,05$); (A, B, C) Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os períodos de cultivo no mesmo tratamento ($P < 0,05$). α -MEM: meio sem antioxidantes; AO: α -MEM contendo antioxidantes e RT: rutina.

51

Figura 5 - Percentagens de oócitos totalmente crescidos após cultivo de folículos secundários em diferentes meios adicionados ou não de diferentes concentrações de rutina. (a, b, c) Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo período ($P < 0,05$). α -MEM: meio sem antioxidantes; AO: α -MEM contendo antioxidantes e RT:

rutina.

52

Figura 6 - Folículo viável após cultivo em α -MEM + RT 0,1 marcado em verde por calceína-AM (A) e folículo degenerado após cultivo em meio AO marcado em vermelho por etídio- homodímero 1 (B). α -MEM: meio sem antioxidante; AO: α -MEM contendo antioxidantes e RT: rutina.

53

Figura 7 - Fragmentação do DNA em oócitos ovinos após 12 dias de cultivo corados com TÚNEL (A, B, C) e Hoechst 33342 (D, E, F). Oócito normal em meio AO (A e D), α -MEM + RT 0,1 (B e E) e do oócito apoptótico no controle positivo (C e F). Nota-se a fragmentação de DNA, como evidenciado pela cromatina verde na Figura C (controle positivo). O: oócito; As setas demonstram: cromatina nuclear. Barras de escala: 50 μ m. α -MEM: meio sem antioxidante; AO: α -MEM contendo antioxidantes e RT: rutina.

53

Figura 8 - Imagens fotomicrográficas de epifluorescência de oócitos ovinos. (a) Os mesmos oócitos foram marcados em azul CellTracker (A, D), 2', 7'-diacetato dichlorodihydrofluorescein (B, E) e MitoTracker Red (C, F) para detectar os níveis intracelulares de GSH, EROs e mitocôndrias ativas, respectivamente. Oócitos cultivados em α -MEM + RT 0,1 (A-C) ou AO (D-F); Barras de escala: 50 μ m (100x). (b) os níveis intracelulares de GSH, ROS e mitocôndrias ativas em oócitos de ovinos após 12 dias de cultivo in vitro em meio AO ou em α -MEM + RT 0,1. α -MEM: meio sem antioxidante; AO: α -MEM contendo antioxidantes e RT: rutina. (A, B) Barras com letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

54

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
≥	Maior ou igual
μm	Micrômetro(s)
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
AKT	Proteína quinase
AMH	Hormônio antimulleriano
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
BMP	Proteína Morfogenética Óssea
BSA	Albumina sérica bovina
CAT	Catalase
CCO	Complexo cumulus-oócito
CGP	Células germinativas primordiais
CO ₂	Dióxido de carbono
CoQ	coenzima Q
Cu ⁺	Cobre
DCF	2',7'-dichlorofluorescein (2'-7'dichlorofluoresceina)
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
E ₂	Estradiol
EGF	Epidermal Growth Factor (Fator de Crescimento Epidermal)
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EthD-1	Etídio homodímero 1
Fe ²⁺	Ferro
FGF	Fibroblast Growth Factor (Fator de crescimento fibroblástico)
FOXO3	FOXO3 forkhead box O3 (Fator de transcrição Forkhead BOX O3)
FSH	Hormônio Folículo Estimulante

GDF-9	Growth differentiation factor-9 (Fator de crescimento e diferenciação-9)
GH	Hormônio do crescimento
GPX	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduced
Gsk3A	Glycogen synthase kinase-3 alpha (Glicogênio sintase quinase 3A)
GSSG	Glutathione oxidized
H	Hours
H ₂ DCF	2'-dichlorofluorescein 7 (Dichlorofluoresceína 2'-7)
H ₂ DCFDA	2', 7'-diacetate dichlorodihydrofluorescein (2', 7'-diacetate of dichlorodihydrofluorescein)
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide
IGF-1	Insulin-like growth factor 1 (Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1)
KGF	Keratinocyte growth factor (Fator de crescimento de queratinócitos)
KL	Kit Ligand
LDL	Lipoprotein of low density
LH	Luteinizing hormone
LIF	Leukemia Inhibitory Factor (Fator inibidor de leucemia)
m	Meter(s)
μg	Microgram(s)
MAPKs	Mitogen Activated Protein Kinases (Proteínas quinases ativadas por mitógenos)
MEM	Minimum Essential Medium
mg	Miligram(s)
mL	Mililiter(s)
MOIFOPA	Manipulation of Oocytes Included in Follicles Ovarian Pre-Antral

mTOR	Mechanistic target of rapamycin (Complexo alvo da rapamicina)
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato)
ng	Nanograma
nm	Nanômetros
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
°C	Graus Celsius
OH [•]	Radical hidroxila
P < 0,05	Probabilidade de erro menor do que 5%
P ₄	Progesterona
PBS	Phosphate buffered saline (Tampão fosfato salino)
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinases
Pten	Phosphatase and tensin homolog (Fosfatase homóloga à tensina)
SOD	Superóxido dismutase
Tdt	Transferase desoxinucleotidil terminal (Enzima deoxinucleotídeo transferase)
TGF-β	Transforming growth factor beta 1 (Fator de crescimento e transformação beta)
TNFr-α	Tumor necrosis factor-α receptor (Receptores do fatores de necrose tumoral)
TNFα	Tumor necrosis factor alpha (Fator de Necrose Tumoral-alfa)
TSC	Tuberous sclerosis complex (Complexo esclerose tuberosa)
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling
UVB	Radiação ultravioleta B
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (Fator de crescimento endotelial vascular)
VIP	Vasoactive Intestinal Peptide (Peptídeo vasoativo)

	intestinal)
ZP	Zona pelúcida
α -MEM	Meio Essencial Mínimo-alfa modificado
μ g	Micrograma(s)
μ L	Microlitro(s)
μ M	Micromolar

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	DESENVOLVIMENTO	15
	2.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
	2.1.1. Ovário ovino	15
	2.1.1.1. Oogênese e foliculogênese	16
	2.1.1.2. Formação e caracterização dos folículos pré-antrais	18
	2.1.1.3. Formação e caracterização dos folículos antrais	21
	2.1.2. População e atresia folicular	22
	2.1.3. Estresse oxidativo folicular	25
	2.1.4. Metabolismo energético folicular	27
	2.1.5. Biotécnica MOIFOPA	28
	2.1.6. Cultivo <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais	29
	2.1.7. Rutina	31
	2.1.8. Técnicas utilizadas para avaliação da qualidade folicular durante o cultivo <i>in vitro</i>	33
	2.2. JUSTIFICATIVA	37
	2.3. OBJETIVOS	38
	2.3.1. Objetivo geral	38
	2.3.2. Objetivos específicos	38
	2.4. CAPÍTULO 1	39
	2.5 REFERÊNCIAS	58
	ANEXO 1	74

1. INTRODUÇÃO

A compreensão da fisiologia ovariana em ovinos, associada ao desenvolvimento de biotecnologias na área da reprodução animal, abrem inúmeras possibilidades para proporcionar um melhoramento genético dos rebanhos e um aumento na produtividade destes animais, que desempenham um importante papel sócio-econômico no Nordeste Brasileiro. Dentre as biotécnicas da reprodução, destaca-se a Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais (MOIFOPA), também conhecida como ovário artificial, que se destaca pela potencialidade de recuperar milhares de oócitos viáveis inclusos em folículos pré-antrais e, posteriormente, promover seu desenvolvimento *in vitro* até a maturação, prevenindo o processo de atresia (morte folicular) que ocorre naturalmente *in vivo* (FIGUEIREDO et al., 2010).

No entanto, sabe-se que durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, pode ocorrer um aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs), causando estresse oxidativo e prejudicando o desenvolvimento oocitário (AGARWAL et al., 2006). Portanto, para evitar que o estresse oxidativo ocorra e reduza a eficiência das biotécnicas da reprodução, cuidados especiais devem ser tomados, como a adição de antioxidantes ao meio de cultivo.

Os antioxidantes apresentam efeitos benéficos na sobrevivência e no desenvolvimento folicular *in vitro*, através do sequestro ou neutralização de EROs e do aumento dos níveis de enzimas antioxidantes (TALEBI et al., 2012; ABEDELAHI et al., 2010). Desta forma, alguns estudos têm avaliado o efeito de antioxidantes na suplementação do meio de cultivo. Uma substância natural que tem demonstrado potencial antioxidante em diferentes tipos celulares (WEI et al., 2011; MATA-CAMPUZANO et al., 2012) e que, possivelmente, auxiliaria na viabilidade folicular *in vitro* é a rutina.

A rutina é um flavonoide muito encontrado em plantas (WEI et al., 2011) e que possui várias propriedades fisiológicas, incluindo antioxidante, anti-inflamatória e anti-cancerígena (SHEN et al., 2004). Estudos recentes mostraram que a rutina apresentou atividade antioxidante ao proteger espermatozoides de veados galheiros contra o estresse oxidativo por meio da redução da peroxidação lipídica, das EROs e dos danos ao DNA (MATA-CAMPUZANO et al., 2012). Além disso, a

rutina preservou a viabilidade e a motilidade de espermatozoides humanos (MORETTI et al., 2012), e restaurou, parcialmente, a atividade da enzima catalase (CAT) em células ovarianas de hamster chinês expostas ao cholestantriol (AHERNE; O'BRIE, 1999).

Apesar de possuir ação antioxidante em diferentes tipos celulares, ainda não existem estudos sobre o efeito da rutina no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais ovinos isolados. Além disso, não é conhecido qual efeito a rutina teria em meio de cultivo já suplementado com outros antioxidantes, ou seja, não se sabe se ela poderia atuar sinergicamente potencializando o efeito protetor deles ou promover o efeito contrário.

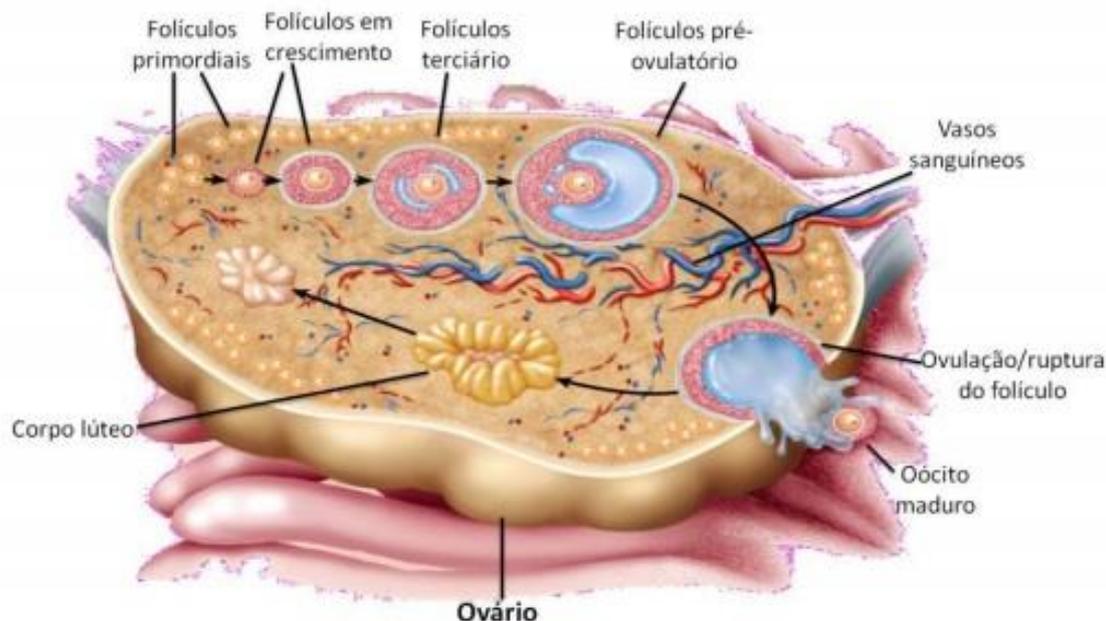
2. DESENVOLVIMENTO

2.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.1. Ovário ovino

O ovário ovino, assim como na maioria das fêmeas mamíferas, é um órgão heterogêneo e composto por duas regiões distintas: uma medular, que na maioria das espécies consiste na porção interna do ovário e é responsável pela sustentação e nutrição desse órgão; e uma cortical, mais externa, que contém corpos lúteos, albicans e folículos ovarianos em diferentes estádios de desenvolvimento (LEITÃO et al., 2009; Figura 1). A gônada feminina desempenha uma função endócrina (produção e liberação de hormônios esteroides e diversos peptídeos) e uma função exócrina ou gametogênica (produção e liberação de oócitos), as quais são exercidas pela interação de dois fenômenos que ocorrem no ovário, a oogênese e a foliculogênese (MATSUDA et al., 2012).

Figura 1 - Desenho esquemático do ovário mamífero, destacando os folículos ovarianos em diferentes estádios de desenvolvimento.



Fonte: GONÇALVES, 2012

2.1.1.1. Oogênese e foliculogênese ovina

A oogênese consiste na formação, crescimento, capacitação e maturação do oócito (HENNET; COMBELLES, 2012), tendo o seu início marcado pela migração das células germinativas primordiais (CGP), originárias do endoderma do saco vitelínico, para a região das gônadas primitivas (PALMA et al., 2012). Em ovinos, esta migração tem início por volta do 20º dia de gestação. As CGP, na região do ovário, multiplicam-se ativamente e transformam-se em oogônias. Estas células apresentam intensa proliferação através da divisão mitótica, mantendo-se diploides (2n) (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008; ALBERTS et al., 2010). No fim do ciclo de divisões mitóticas, as oogônias (2n) aumentam de tamanho e entram em prófase I na primeira meiose, diferenciando-se, assim, em oócitos primários (2n) (MOORE; PERSAUD, 2008; MONIRUZZAMAN; MIYANO, 2010). Em ovinos, a formação dos oócitos primários ocorre aos 55 dias de gestação (McNATTY et al., 2000; GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008). No estágio de diplóteno ou vesícula germinativa da prófase I, ocorre a primeira interrupção da divisão meiótica dos oócitos primários, que permanecem neste estágio até a puberdade (FIGUEIREDO et al., 2008; CHEN et al., 2012).

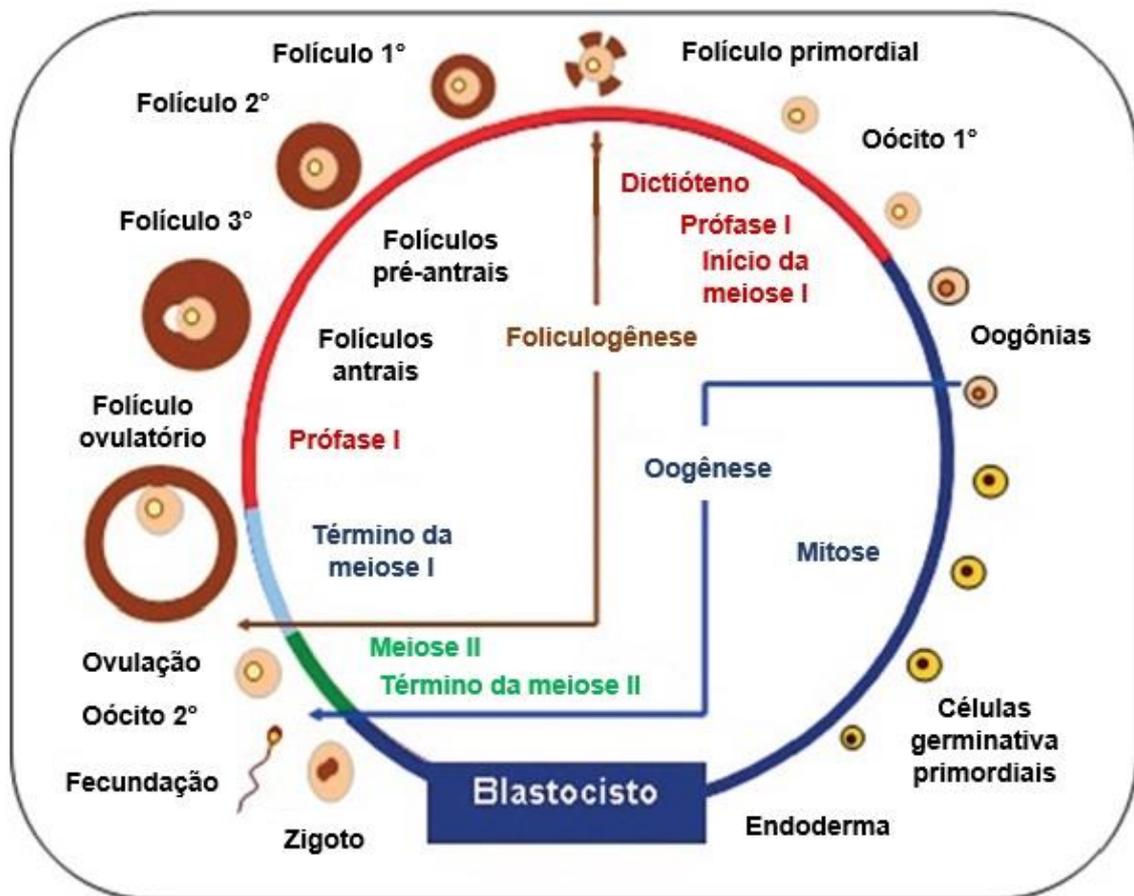
Com a liberação do pico pré-ovulatório do Hormônio Luteinizante (LH) e consequente retomada da meiose, ocorre a formação de oócitos secundários haplóides (n) e a segunda parada da meiose, na fase de metáfase II (HUTT; ALBERTINI, 2007). A meiose será retomada novamente após a fecundação do oócito pelo espermatozoide, originando o oócito haploide fecundado, marcando, assim, o fim do desenvolvimento oocitário (FIGUEIREDO et al., 2008).

O folículo ovariano é considerado a unidade morfofuncional do ovário, e é constituído por um oócito circundado por células somáticas, da granulosa e/ou da teca (EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009). A foliculogênese é conhecida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, a qual se inicia com a formação do folículo primordial e culmina com o folículo em estágio pré-ovulatório (CELESTINO et al., 2009). É marcada por um período de proliferação das células da granulosa que circundam o oócito e pelo crescimento oocitário, que é acompanhado por expressão gênica seletiva para atender a demandas de estocagem de organelas e macromoléculas que serão herdadas pelo embrião (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). O ovário ovino consiste em um número finito de

folículos no momento do nascimento, com a maioria em um estado de repouso, aguardando recrutamento (GREEN; SHIKANOV, 2016).

O desenvolvimento do folículo pré-antral, é constituído por duas fases distintas e consecutivas: a primeira, caracteriza-se pela formação e o início do crescimento de folículos primordiais; e a segunda, em que o crescimento de folículos primários e secundários ocorre devido à proliferação das células da granulosa concomitantemente com um aumento no tamanho do oócito (ARAÚJO et al., 2014).

Figura 2. Representação esquemática dos processos de oogênese e foliculogênese.



Fonte: Adaptado de VAN DEN HURK; ZHAO, 2005

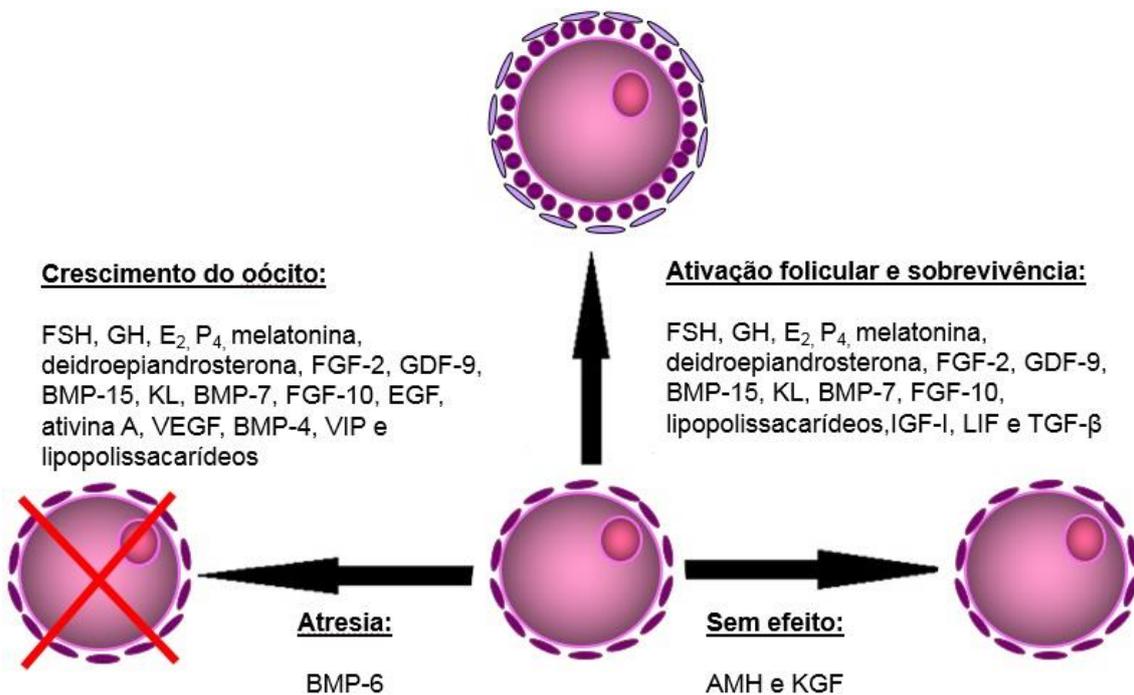
2.1.1.2. Formação e caracterização dos folículos pré-antrais

O folículo mais precoce presente no ovário é o primordial, o qual representa 95% dos folículos pré-antrais (OKTEM; URMA, 2010). Folículos primordiais quiescentes, são formados por um oócito, em prófase I da meiose, circundado por uma camada de células somáticas de morfologia pavimentosa (pré-granulosa) (FIGUEIREDO et al., 2007). As células da pré-granulosa são oriundas do mesonéfron e/ou do epitélio germinativo ovariano (McNATTY et al., 2000). Os folículos primordiais saem do *pool* de reserva e passam para o *pool* de folículos em crescimento (transição, primário e secundário) (SILVA et al., 2004). Os folículos de transição são caracterizados pela mudança de algumas células foliculares pavimentosas para cúbicas, processo denominado ativação (FIGUEIREDO et al., 2007). A ativação dos folículos primordiais é um processo irreversível; por conseguinte, é importante na regulação do tamanho do *pool* de reserva de folículos primordiais, o que afetará a vida útil reprodutiva e a fertilidade (YANG; FORTUNE, 2008).

Os fatores e mecanismos responsáveis pelo controle da foliculogênese precoce ainda são pouco conhecidos e representam uma das principais questões relacionadas com a biologia ovariana (ARAÚJO et al., 2014). Alguns estudos demonstraram que um grande número de fatores de crescimento e hormônios está envolvido na ativação de folículos primordiais (SILVA et al., 2016) (Figura 3). Dentre as substâncias que promovem a ativação e mantém a sobrevivência folicular, destacam-se: Fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF-9) (cabra: MARTINS et al., 2008), Proteína morfogenética óssea-15 (BMP-15) (cabra: CELESTINO et al., 2011; LIMA et al., 2012), Fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) (cabra: MARTINS et al., 2010), Kit Ligand (KL) (cabra: CELESTINO et al., 2010; ovino: CAVALCANTE et al., 2015), Proteína morfogenética óssea-7 (BMP-7) (cabra: CELESTINO et al., 2011), Fator inibidor de leucemia (LIF) (cabra: NÓBREGA et al., 2012), Fator de crescimento fibroblástico-2 (FGF-2) (cabra: MATOS et al., 2007a; SANTOS et al., 2014), Fator de crescimento fibroblástico-10 (FGF-10) (cabra: CHAVES et al., 2010; ALMEIDA et al., 2015), Fator de crescimento e transformação beta (TGF- β) (cabra: RODRIGUES et al., 2014), Hormônio folículo estimulante (FSH) (cabra: SILVA et al., 2004), Estradiol (E₂), Progesterona (P₄) (cabra: LIMA-VERDE et al., 2010; LIMA-VERDE et al.,

2012), Hormônio do crescimento (GH) (cabra: MARTINS et al., 2014) e Deidroepiandrosterona (ovelhas: NARKWICHEAN et al., 2014). Exceto para IGF-1 e LIF, todos estes fatores de crescimento, bem como de Fator de crescimento epidermal (EGF) (cabra: SILVA et al., 2004; ovelhas: ANDRADE et al., 2014), Ativina A (cabra: SILVA et al., 2006), Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (cabra: BRUNO et al., 2009), Proteína morfogenética óssea-4 (BMP-4) (ovelhas: BERTOLDO et al., 2014) e Peptídeo vasoativo intestinal (VIP) (cabra: BRUNO et al., 2010) também aumentam o crescimento do oócito (Figura 3). Por outro lado, o Fator de crescimento de queratinócitos (KGF) (cabra: FAUSTINO et al., 2013) e Hormônio antimulleriano (AMH) (vaca: GIGLI et al., 2005) não têm nenhum efeito na ativação do folículo, ao passo que Proteína morfogenética óssea-6 (BMP-6) aumenta a atresia folicular *in vitro* (cabra: ARAÚJO et al., 2010).

Figura 3. Fatores que controlam a ativação, crescimento e sobrevivência de folículos primordiais.



Fonte: Adaptado de SILVA et al., 2016.

Na ativação de folículos primordiais, de um modo geral, os fatores de crescimento, como KL, ativam a via de fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) em

oócitos. A via PI3K inclui componentes como serina/treonina-quinase (Akt), fator de transcrição forkhead 3 (FOXO3), glicogênio sintase quinase 3A (GSK3A), e fosfatase e tensina homóloga excluída no cromossomo 10 (PTEN) (ratos: LIU, et al., 2007).

Em mamíferos, a ativação de folículos primordiais está associada à perda da PTEN do oócito e translocação citoplasmática (exportação nuclear) de FOXO3 (JOHN et al., 2008; REDDY, et al., 2008; BROMFIELD; SHELDON, 2013). Além disso, estudos demonstraram que a inibição do FOXO3 induz a ativação de folículos primordiais em suínos (MONIRUZZAMAN et al., 2010) e vacas (BAO et al., 2011).

Outra via de ativação folicular é o Complexo alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), que é uma cinase de serina/treonina que regula o crescimento e proliferação celular em resposta a fatores de crescimento e nutrientes (REDDY et al., 2008). A mTOR atua concomitantemente com a via PI3K, pois ativa a Akt pela fosforilação da sua parte Serina 473. Entretanto, a mTOR pode ser inibida pelo Complexo esclerose tuberosa (TSC), que age em sinergismo com a PTEN suprimindo a ativação folicular (ADHIKARI et al., 2010).

Após a ativação folicular, os folículos primários são formados. Esses folículos são compostos por um oócito circundado por uma camada de células da granulosa cúbicas (FIGUEIREDO et al., 2007). Com o surgimento do folículo primário e a multiplicação das suas células da granulosa, ocorre a formação de várias camadas destas células ao redor do oócito, formando os folículos secundários. Nesta categoria folicular, a presença da zona pelúcida (ZP) circundando o oócito já é claramente visível (LUCCI et al., 2001). Esta é formada por glicoproteínas secretadas pelo oócito durante o seu crescimento. A ZP forma uma camada protetora ao redor do oócito e é constituída por três glicoproteínas (ZP1, ZP2 e ZP3), com a expressão da ZP2 já acontecendo em folículos primordiais (ARAÚJO et al., 2014), sugerindo que o material da ZP está presente desde o início da foliculogênese. Além disso, durante o crescimento dos folículos secundários, ocorre a diferenciação das células do estroma em células da teca ao redor do folículo (FIGUEIREDO et al., 2007). Estas células são fundamentais para o crescimento folicular, pois são a principal fonte de síntese de andrógenos no ovário, fornecendo precursores para a esteroidogênese e síntese de estrógeno nas células da granulosa (OKTEM; URMAN, 2010).

Com o aumento no número de camadas de células da granulosa e de células da teca, aumenta também a distância do suprimento sanguíneo do oócito. Assim, um mecanismo de comunicação intercelular mediado pelas junções entre as células foliculares (junções comunicantes “*gap*” e junções aderentes) permite a passagem de nutrientes essenciais (aminoácidos, nucleotídeos, hormônios, fatores de crescimento, entre outros) do sangue ao oócito (WRIGHT et al., 2001). Além disso, essas junções podem atuar em vias de sinalização celular e na regulação da transcrição gênica nas células somáticas e oócito. Tem sido relatado também que a comunicação direta célula-célula via junções *gap* está envolvida no crescimento do folículo (WRIGHT et al., 2001) e na maturação do oócito (GERSHON; PLAKS; DEKEL, 2008) através da passagem de substâncias que controlam esse processo, como íons e metabólitos de baixo peso molecular (SANTIQUET; ROBERT; RICHARD, 2013).

2.1.1.3. Formação e caracterização dos folículos antrais

Com o crescimento dos folículos secundários e organização das células da granulosa em várias camadas, estas células formam uma barreira epitelial, favorecendo um movimento seletivo de fluido de fora para dentro do folículo, no espaço entre as células da granulosa, que é essencial para a formação da cavidade antral (RODGERS; IRVING-RODGERS, 2010). Esta possui um fluido composto de importantes substâncias para a manutenção do oócito, como água, eletrólitos, proteínas séricas e alta concentração de hormônios esteróides, secretados pelas células da granulosa (BARNETT et al., 2006). A partir desse estágio, os folículos são denominados de terciários. O desenvolvimento dos folículos terciários é caracterizado por uma fase dependente de gonadotrofinas, as quais irão desencadear os mecanismos de crescimento, recrutamento, seleção e dominância folicular (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Acredita-se que a dominância folicular inicia-se quando os folículos maiores passam a produzir altos níveis do IGF-1, estradiol e inibina, responsáveis por modular a liberação de FSH pela adenohipófise (DRIANCOURT, 2001). No último estágio do desenvolvimento folicular, observa-se a formação do folículo pré-ovulatório. Este é caracterizado por um oócito circundado por células da granulosa especializadas que são

denominadas de células do cúmulus. As células da granulosa de folículos pré-ovulatórios param de se multiplicar em resposta ao hormônio luteinizante (LH) e iniciam o programa final de diferenciação (SÁNCHEZ e SMITZ, 2012). Em todas as espécies, a formação de folículos pré-ovulatórios ocorre geralmente a partir da puberdade (DRIANCOURT, 2001). Estes folículos adquirem mais receptores para o LH, principalmente nas células da granulosa, e aumentam a sua dependência, resultando, por fim, na ovulação do complexo cumulus-oócito (CCO) em resposta ao pico pré-ovulatório de LH, propiciando, assim, a manutenção da fertilidade das fêmeas mamíferas (DRIANCOURT, 2001; MATSUDA et al., 2012).

2.1.2. População e atresia folicular

Os folículos pré-antrais representam cerca de 90 a 95% de toda a população folicular e, desta forma, armazenam a grande maioria dos oócitos presentes em ovários mamíferos. Em especial, 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., 2011). Entretanto, recentemente, alguns pesquisadores têm demonstrado a possibilidade da formação, após o nascimento, de oócitos (WHITE et al., 2012), marcando, assim, o surgimento da teoria da neofoliculogênese. Estes estudos apontam para uma grande mudança de paradigma na biologia reprodutiva de fêmeas mamíferas.

Independente da neofoliculogênese, a população folicular varia entre as espécies, sendo de aproximadamente 160.000 na ovelha (DRIANCOURT, 1991). Apesar desta grande população folicular presente no ovário ovino, a quase totalidade dos folículos, ou seja, 99,9%, não alcança a ovulação, morrendo por um processo fisiológico denominado atresia (MATSUDA et al., 2012). Apesar da grande perda folicular, este é um processo importante para a manutenção da ciclicidade ovulatória animal (AMSTERDAM et al., 2003). O processo de atresia folicular nos animais domésticos e primatas tem início ainda na vida fetal (PALMA et al., 2012) e pode ocorrer pelo processo degenerativo de necrose ou por via apoptótica (CHEN et al., 2005; VALDEZ; CUNEO; TURZILLO, 2005).

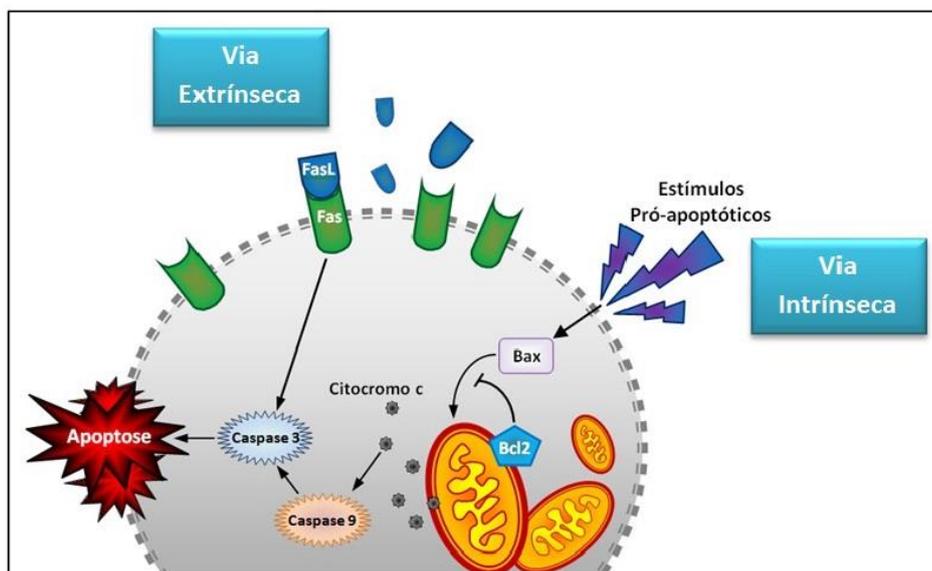
Apoptose ou morte celular programada é um processo essencial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, sendo importante para eliminar

células supérfluas ou defeituosas. Durante a apoptose, a célula sofre alterações morfológicas características desse tipo de morte celular, tais como retração da celular, perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do DNA e formação dos corpos apoptóticos (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). Estes últimos, posteriormente serão fagocitados pelos macrófagos (SAIKUMAR; VENKATACHALAM, 2013). Dessa forma, deve haver equilíbrio entre a proliferação celular e a apoptose, caso contrário, ela se torna um processo de perturbação da homeostase, tornando-se indesejável (SURAI, FISININ e KARADAS, 2016).

A apoptose é o principal responsável pela perda da reserva ovariana (GOUGEON, 2010). Muitas são as moléculas envolvidas no controle das vias de ativação da apoptose, dentre estas, estão as proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas, além das caspases (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). A ativação das caspases é um ponto-chave para desencadear a apoptose. Estas podem ser ativadas por duas vias principais: a via extrínseca ou via do receptor de morte e pela via intrínseca ou via mitocondrial (BEATTIE, 2007; Figura 4).

A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos aos receptores Fas, membros da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF). Esta ligação é capaz de ativar a cascata das caspases (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007); inicialmente, são ativadas as caspases iniciadoras (caspase-8 e 9), que ativam as caspases executoras, tais como a caspase-3 e caspase-7 (JIANG; WANG, 2004), responsáveis pela clivagem de proteínas essenciais, conduzindo à morte celular (HUTT, 2015). Por sua vez, a via intrínseca é ativada por estresses diversos, como a privação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes. Estes sinais são transduzidos até as mitocôndrias, as quais liberam moléculas pró-apoptóticas, como o citocromo c, no citoplasma (DESAGHER; MARTINOU, 2000; HENGARTNER, 2000), estimulando a ativação das caspase-9 e caspase-3 (RUPNARAIN et al., 2004) e, conseqüentemente, a apoptose celular.

Figura 4. Representação esquemática das vias celulares, extrínseca e intrínseca, do processo apoptótico.



Fonte: LIMA et al., 2011.

No que se refere ao processo degenerativo de necrose, este é iniciado por uma perda da homeostase celular e é caracterizado pela lise e desintegração da célula. Geralmente, a necrose é iniciada por mecanismos não celulares como isquemia, deficiência de níveis de ATP e traumas, levando a danos irreversíveis na célula (McCULLY et al., 2004).

Entretanto, a atresia pode ainda ser ocasionada por esses dois fatores, apoptose e necrose, em conjunto e não apenas isoladamente, ou seja, 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 final da atresia, no entanto, as alterações morfológicas acentuadas parecem estar envolvidas com a necrose. Além disso, as células também apresentam alterações mais drásticas, incluindo dilatações de membrana nuclear, ausência de cristas nas mitocôndrias e presença de vacúolos citoplasmáticos (AGUIRRE et al., 2013).

2.1.3. Estresse oxidativo folicular

O estado oxidativo e o metabolismo energético adequados são pré-requisitos para se evitar o processo de atresia e para que haja, assim, um desenvolvimento oocitário satisfatório. O desequilíbrio entre a geração de EROs e a capacidade dos sistemas de defesa antioxidantes para eliminá-las, tem sido reconhecido como um fator de risco ao folículo.

As EROs são átomos, moléculas ou quaisquer compostos que contenham um ou mais elétrons desemparelhados. Biologicamente, as EROs mais relevantes são derivadas a partir de oxigênio e nitrogênio (SURAI, 2006). Elas são geradas pelo metabolismo energético normal e funcionam como moléculas de sinalização celular importantes. Em condições homeostáticas, as EROs intracelulares são mantidas em concentrações adequadas para cumprir essas funções e todos os excessos são tamponados por várias enzimas e moléculas antioxidantes. Se houver um aumento da produção de EROs além da capacidade de tamponamento, estas espécies reativas desencadeiam reações descontroladas com compostos intracelulares não-alvo, como os ácidos nucleicos, proteínas de membrana e outros lipídios. À medida que o número de compostos oxidados aumenta, o estado redox intracelular da célula começa a se afastar do seu ambiente redutor normal (STEFANSON e BAKOVIC, 2014).

O organismo lança mão de mecanismos para manter o equilíbrio redox nas células pela produção de substâncias que podem ser enzimáticas ou não enzimáticas. As defesas enzimáticas mais relevantes são: a superóxido dismutase (SOD) que catalisa a conversão do superóxido em peróxido de hidrogênio (KRISHNAMURTHY e WADHWANI, 2012), a catalase (CAT) que converte, o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (BEATTIE, 2007) e a glutathiona peroxidase (GPX) que destrói peróxido de hidrogênio, mas para isso depende da glutathiona reduzida (GSH), que sofre oxidação e converte-se em glutathiona oxidada (GSSG). Por sua vez, a glutathiona redutase (GR) regula os níveis de GSH e a ação da glutathiona peroxidase, ao reduzir a GSSG em GSH através da oxidação do NADPH proveniente da via das pentoses (KULBACKA et al., 2012).

Além das defesas de natureza enzimática, existem outras moléculas antioxidantes denominadas de não enzimáticas, que podem ser produzidas pela própria célula (glutathiona na forma reduzida (GSH), coenzima Q, ácido úrico, o

ácido lipóico e a bilirrubina) ou obtidas pela dieta (vitamina C, E, A, etc) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Na reprodução, o estresse oxidativo pode provocar efeitos deletérios tanto ao sistema reprodutor feminino como ao masculino. No que diz respeito às fêmeas, os danos celulares podem ocorrer desde o processo de maturação do oócito até à gestação (ANDRADE et al, 2010). Com efeito, a regulação da geração de EROs é necessária à retomada da primeira (TAKAMI et al., 1999) e segunda divisão meiótica oocitária (BEHRMAN et al., 2001), à fecundação do oócito, bem como ao desenvolvimento *in vitro* de embriões (ANDRADE et al, 2010). Assim, é essencial que haja um sistema de defesa antioxidante cujo objetivo primordial seja manter o processo oxidativo dentro dos limites fisiológicos e passíveis de regulação, impedindo que os danos oxidativos se amplifiquem, culminando em danos sistêmicos irreparáveis.

Tal como em outros tecidos, a defesa antioxidante celular do ovário é composta por uma série de enzimas citoplasmáticas e mitocondriais (MENG et al., 2016). Os compostos antioxidantes protetores estão localizados em organelas, compartimentos subcelulares, ou no espaço extracelular, permitindo que ocorra a máxima proteção celular. Assim, o sistema antioxidante da célula viva inclui três níveis principais de defesa. O primeiro nível de defesa é responsável pela prevenção da formação de EROs através da remoção de precursores das mesmas ou por catalisadores de inativação e consiste de três enzimas antioxidantes principais como superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT), além de proteínas de ligação a metais, como a transferrina. Por conseguinte, o segundo nível de defesa consiste em antioxidantes que previnem a peroxidação lipídica por eliminar radicais peróxidos, sendo composto pela vitamina E, coenzima Q (CoQ), carotenóides, vitamina A, ácido ascórbico, ácido úrico e alguns outros antioxidantes, como a glutatona (GSH) e tioredoxina. No entanto, tanto o primeiro como o segundo nível de defesa antioxidante na célula podem não ser capazes de prevenir os efeitos prejudiciais da EROs sobre os lípidios, proteínas e DNA. Neste caso, o terceiro nível de defesa baseia-se em sistemas para eliminar moléculas danificadas ou repará-las. Este nível inclui enzimas lipolíticas (lipases), proteolíticas (peptidases ou proteases) e outras enzimas (enzimas de reparo do DNA, ligases, nucleases, polimerases, proteinases, fosfolipases e transferases). Todos estes antioxidantes funcionam no organismo, em associação uns com os

outros, formando um sistema antioxidante integrado (SURAI, FISININ e KARADAS, 2016).

2.1.4. Metabolismo energético folicular

Responsáveis pela respiração celular (fosforilação oxidativa) e manutenção da vida dos seres aeróbicos, a mitocôndria também é a principal geradora de EROs em mamíferos (SILVA; FERRARI, 2011), além de participar na sinalização celular, destacando-se a regulação da permeabilidade da membrana e a morte celular por apoptose (LI; DEWSON, 2015). A fosforilação oxidativa é a fase final na síntese de ATP onde ocorre a formação de EROs (FERREIRA; ABREU, 2007), sendo as principais: o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^*) (DAKUBO, 2010).

Grande parte da energia produzida no folículo é gerada por meio de fosforilação oxidativa, o que implica em cinco complexos enzimáticos (BLIER; DUFRESNE; BURTON, 2001). Os complexos de I a IV (cadeia de transporte de elétrons) estão envolvidos no transporte de elétrons através de uma série de proteínas via reações redox (reduções oxidativas), tendo como destino final uma molécula de oxigênio. Em circunstâncias normais, o oxigênio é, então, convertido em água no complexo IV, e a energia é estocada e usada para a produção de ATP no complexo V. Porém, durante esse processo, uma pequena porcentagem do oxigênio consumido pela mitocôndria no complexo IV, é convertida em uma das várias EROs, em vez de água. Portanto, paradoxalmente, um processo fundamental para a viabilidade celular, a fosforilação oxidativa é também um dos principais responsáveis pela produção de EROs. Essas espécies são produzidas, ainda, por outras reações redox, como aquelas envolvidas em mecanismos de defesa contra patógenos, por exemplo o caso da oxidase NADPH (DOWLING; SIMMONS, 2009).

Diante da grande perda folicular que ocorre *in vivo* e da importância das EROs, dos agentes antioxidantes e da atividade mitocondrial em nível oocitário e folicular, faz-se necessário aprimorar as biotécnicas reprodutivas que auxiliam no melhor entendimento destes fatores sobre a foliculogênese. Dentre estas técnicas,

destaca-se a Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais (MOIFOPA) ou ovário artificial.

2.1.5. Biotécnica de MOIFOPA

A MOIFOPA, compreende as etapas: isolamento, conservação (por resfriamento e/ou criopreservação) e posterior cultivo *in vitro* dos folículos pré-antrais a partir dos ovários, antes que eles sofram o processo de atresia (FIGUEIREDO et al., 2011). Durante as duas últimas décadas, foram alcançados avanços importantes sobre os processos que envolvem o crescimento e a maturação *in vitro* de oócitos oriundos do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais. Estes avanços incluem: informação sobre o papel de vários hormônios e fatores de crescimento na ativação folicular *in vitro*; o aumento da compreensão da via intracelular envolvida na iniciação do crescimento folicular primordial; o crescimento de folículos primários e secundários até a fase antral; e a produção de embriões a partir de oócitos de folículos pré-antrais cultivados *in vitro* (SILVA et al., 2016).

Em animais de fazenda, grandes esforços foram feitos para produzir embriões viáveis a partir do oócitos de folículos secundários crescidos *in vitro* em várias espécies (caprina: SARAIVA et al., 2011; MAGALHÃES-PADILHA et al., 2011; ovina: BARBONI et al., 2011; ARUNAKUMARI; SHANMUGASUNDARAM; RAO, 2010; LUZ et al., 2013; bubalina: GUPTA et al., 2008; e suína: WU; EMERY e CARREL, 2001; WU; TIANG, 2007). No entanto, exceto para a espécie bubalina, a percentagem de embriões produzidos *in vitro* utilizando estes oócitos é muito baixa (aproximadamente 1%), e os embriões não são capazes de se desenvolver para a fase de blastocisto. Em animais silvestres (macaco) também foi produzido embrião de oócitos oriundos de folículos secundários crescidos *in vitro* (TING; XU e STOUFFER, 2015). Apesar de diversos resultados positivos que foram descritos em estudos relacionados com a produção de oócitos competentes viáveis obtidos a partir de folículos secundários cultivados em camundongos, a produção de embriões em espécies domésticas ainda é extremamente baixa e variável, sendo a sua utilização não adaptada numa base comercial (GILBERT et al., 2012). Neste sentido, pesquisadores têm estudado os tipos de sistemas de cultivo a serem empregados, os métodos de isolamento folicular, bem como um meio com

composição ideal (FIGUEIREDO *et al.*, 2011), na tentativa de melhorar as condições de cultivo e, assim, os resultados atuais com cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais.

2.1.6. Cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais

O cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais tem como grande desafio reproduzir ou mimetizar, *in vitro*, a dinâmica do ambiente ovariano, uma sequência metódica de comunicação celular, e a interação com fatores de secreção, hormonais e de crescimento, visto que o desenvolvimento folicular é um processo altamente regulado, dinâmico e que requer a participação de vários fatores autócrinos, parácrinos e endócrinos (GREEN; SHIKANOV, 2016). Desta forma, é uma ferramenta importante para estudar a foliculogênese (FIGUEIREDO *et al.*, 2011). Além disso, clinicamente, o desenvolvimento folicular *in vitro* poderia revolucionar a tecnologia de reprodução assistida, proporcionando um meio de usar os mais numerosos folículos ovarianos imaturos em populações de pacientes que são incapazes de se submeter a estimulação ovariana (GREEN; SHIKANOV, 2016).

Basicamente, existem duas formas de cultivo de folículos pré-antrais: 1) inclusos em fragmentos de tecido ovariano (fatias ou tiras), também chamado de "in situ"; ou 2) usando folículos isolados. Os folículos isolados podem ser cultivados em um sistema de duas dimensões (2D). Nesse sistema, o folículo é colocado na superfície, o que pode ser um 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), numa matriz extracelular (ARAÚJO *et al.*, 2014).

Referente ao cultivo de folículos isolados, o qual permite o monitoramento individual do crescimento folicular, bem como verificar o efeito *in vitro* de diferentes substâncias sobre cada etapa do seu desenvolvimento (ABIR *et al.*, 2001). Este cultivo já foi realizado em diversas espécies (bovina: ARAÚJO *et al.*, 2015; caprina: SÁ *et al.*, 2016; murina: PAZOKI *et al.*, 2015; ovina: LUZ *et al.*, 2013; humana: CAMBONI *et al.*, 2013; macacos: TING, XU e STOUFFER, 2015).

O sistema de cultivo a ser selecionado tem de afetar positivamente a morfologia folicular, a sobrevivência, a proliferação, a esteroidogênese e a expressão gênica. Além disso, é importante para avaliar o efeito de fatores de

crescimento e/ou hormônios no crescimento folicular. O microambiente do folículo tem de ser considerado, assim como o papel de fatores de crescimento e hormônios e suas respectivas vias de sinalização durante o desenvolvimento folicular *in vitro* (ARAÚJO, et al., 2014). Sabe-se que para o crescimento *in vitro* dos folículos, existem componentes fundamentais que devem estar presentes nos meios de cultivo, como nutrientes, eletrólitos, aminoácidos, substratos energéticos, vitaminas, hormônios, fatores de crescimento e antioxidantes (PICTON *et al.*, 2008). Dentre os antioxidantes rotineiramente adicionados ao meio de cultivo de folículos ovinos e caprinos, destacam-se o ácido ascórbico, a transferrina e o selênio.

O ácido ascórbico impede a peroxidação lipídica por extermínio intermediário de radicais peróxidos (SURAI, FISININ e KARADAS, 2016). Estudos *in vitro* mostram que o ácido ascórbico suprime a apoptose em células da granulosa de folículos em ratos (BASINI; TAMANINI, 2000), através da supressão de estresse oxidativo (GÜRGEN et al., 2013). Em suínos, a suplementação de ácido ascórbico no meio de cultivo de embriões não só melhora a taxa de blastocistos e os números de células totais, como também reduz apoptose, entretanto, a dosagem excessiva compromete vários aspectos do desenvolvimento do embrião (KERE et al., 2013).

O selênio é uma parte essencial de uma gama de selênio-proteínas, incluindo GPX, responsável pela decomposição de peróxidos, convertendo-os em não-radicaís ou produtos não tóxicos. Ele também evita danos oxidativos ao DNA mediada por metais (SURAI, FISININ e KARADAS, 2016; ZIMMERMAN et al., 2015). Estudos demonstraram que o selênio aumenta a capacidade de sobrevivência e crescimento de células da granulosa de folículos pequenos (BASINI; TAMANINI, 2000). Contudo, o selênio ou os seus metabólitos podem atuar como pró-oxidantes. As enzimas seleniometionina e metilselenocisteína também apresentam atividade pró-oxidante em células da próstata devido à formação de metil selenol (WEEKLEY; HARRIS, 2013).

A transferrina é uma proteína de ligação a metais, prevenindo a formação de radicais hidroxilas (SURAI, FISININ e KARADAS, 2016). Alguns autores confirmaram que a maturação folicular está relacionada a altos níveis de transferrina e seus receptores na célula (DEMESTERE et al., 2005).

Além das substâncias descritas acima, alguns estudos vêm testando os efeitos da inclusão de outros antioxidantes ao meio de cultivo (GONG E LIM, 2009; LIMA-VERDE et al, 2009; SÁ et al, 2016). Uma substância que vem ganhando notoriedade nos últimos anos devido a suas propriedades citoprotetoras é a rutina.

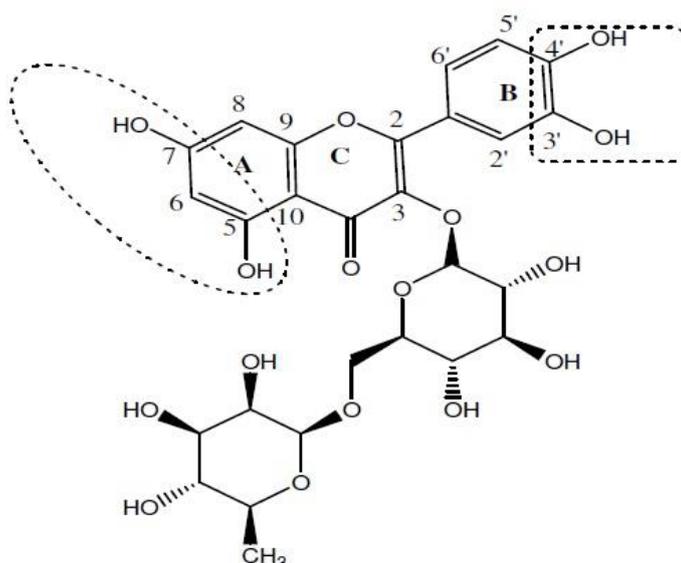
2.1.7. Rutina

A rutina (3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona-3-ramnoglicosídeo) é um flavonoide importante, também conhecida como a vitamina P ou quercetina-3-O-rutinosídeo, que é consumido na dieta diária, sendo encontrado em frutas, legumes ou em plantas medicinais (ATANASSOVA; BAGDASSARIAN, 2009; FENG et al, 2015). A rutina, bem como a maioria dos flavonoides, pode prevenir danos causados por EROs através dos seguintes mecanismos: 1) neutralização direta de EROs; 2) ativação de enzimas antioxidantes; 3) quelação de metais; 4) redução de radicais α -tocoferil; 5) inibição de oxidases; 6) redução do estresse oxidativo causado pelo óxido nítrico; 7) aumento nos níveis de ácido úrico e 8) aumento da atividade de antioxidantes de baixo peso molecular (PROCHÁZKOVÁ; BOUSOVÁ; WILHEMOVÁ, 2011).

A grande maioria dos benefícios terapêuticos atribuídos a rutina reside, principalmente, no seu potencial efeito sequestrador de EROs. Tal flavonóide apresenta em sua estrutura ligações e grupamentos que a habilitam para o sequestro direto de EROs, a saber: (1) os dois grupamentos hidroxilas em configuração *orto* no anel B, que conferem alta estabilidade ao radical formado; (2) dupla-ligação C2-C3 em conjugação com o 4-oxo no anel C, responsável pela deslocalização eletrônica do anel B e (3) a presença de hidroxilas na posição 7 e 5 do anel A, requeridas para potencialização máxima da atividade antioxidante (PIETTA, 2000; HEIM; TAGLIAFERRO e BOBILYA, 2002). Além disso, sua atividade quelante de metais catalizadores de reações de oxidação tais como, cobre (Cu^+) e ferro (Fe^{2+}), pode ser explicada majoritariamente pela presença do grupamento catecol no anel B, bem como pelos grupos 4-oxo e 5-OH presentes no anel C e A respectivamente (HEIM; TAGLIAFERRO e BOBILYA, 2002). Em 1896, foi estabelecida a fórmula definitiva da rutina ($\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$; Figura 5) com a descoberta da ligação dos açúcares glicose e ramnose na molécula da quercetina.

Atualmente existe um grande interesse por parte das indústrias cosméticas e farmacêuticas devido as suas propriedades antioxidantes (VELASCO et al., 2008).

Figura 5. Estrutura química da rutina. Os grupamentos hidroxila em destaque são responsáveis pelo sequestro direto de EROs.



Fonte: PIETTA, 2000; OLIVEIRA et al., 2015

Estudos *in vivo* já demonstraram que a rutina é eficaz contra a lesão cerebral isquêmica quando administrada 1 hora após o evento isquêmico (JANG et al., 2014), bem como pode ser considerada como um suplemento dietético com potencial para a prevenção e tratamento de diabetes tipo 2 e para suprimir o estresse oxidativo mediado por danos na fisiopatologia diabética (DHANYA et al., 2014) em ratos. Na mesma espécie, outros trabalhos indicaram que a aplicação tópica de rutina protege contra danos inflamatórios na pele induzidos por radiação ultravioleta B (UVB), suprimindo a peroxidação lipídica (CHOI et al., 2014). Quando administrada por via oral, a rutina atenuou significativamente as deficiências de memória em ratos transgênicos portadores de Doença de Alzheimer (XU et al., 2014). Além disso, a rutina, em uma dose de 1 $\mu\text{g/mL}$, inibiu significativamente a morte celular induzida por etanol (SONG et al., 2014).

Em relação à reprodução, a rutina exerceu sua ação protetora em espermatozoides sobre danos induzidos por peroxidação lipídica em humanos (MORETTI et al., 2012) e veados galheiros (MATA-CAMPUZANO et al., 2012). A

rutina por pertencer à classe dos flavonoides, em altas concentrações, pode atuar como pró-oxidante (SADEGHIPOUR et al., 2005). Entretanto, estudo *in vivo*, demonstrou que o consumo crônico de dietas maternas contendo quantidades elevadas de rutina durante a gestação e lactação de camundongos-fêmeas não afetou o tamanho da ninhada, desenvolvimento fetal, sobrevivência pós-natal, desenvolvimento do esqueleto ou peso corporal pós-natal da prole (LESSER; KEEN; LANOUE, 2015). Além disso, foi demonstrado que a rutina (5 μ M) é eficiente na supressão do estresse oxidativo *in vitro* induzido pelo colesterol em células ovarianas de hamster fêmeas chinesas (AHERNE; O'BRIE, 1999). Recentemente, nossa equipe demonstrou que a presença da rutina no extrato etanólico da *Morus nigra* pode ter contribuído para redução de células TUNEL positivas (apoptóticas) após preservação de tecido ovariano ovino a 4°C por até 6 h no referido extrato (CAVALCANTE et al., dados não publicados). No entanto, ainda não existe nenhum trabalho demonstrando o efeito antioxidante da rutina sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos secundários isolados ovinos.

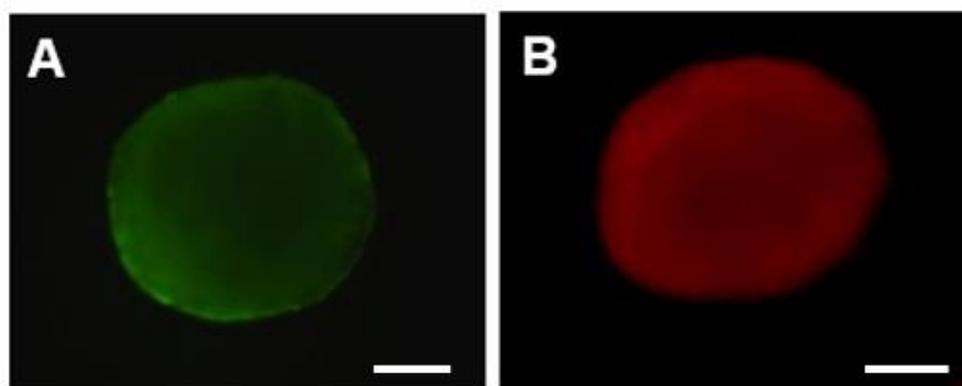
2.1.8. Técnicas utilizadas para avaliação da qualidade folicular durante e após o cultivo *in vitro*

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 e oócitos após o cultivo *in vitro*, mais precisa será a interpretação da qualidade e da viabilidade folicular (MATOS et al., 2007b). Existem técnicas mais simples e menos dispendiosas como o estéreomicroscópio que permite avaliar a morfologia folicular bem como crescimento e formação de antro (BARBERINO et al., 2015).

Uma outra técnica mais sofisticada é a microscopia de fluorescência que 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 e CCOs após cultivo *in vitro* (GOUVEIA et al., 2016; JAIN et al., 2016). Nesta técnica, folículos viáveis e não viáveis 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. 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 nucléicos, produzindo fluorescência vermelha. Assim, a calceína-AM 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 danificada, com elevação de 40 vezes em sua fluorescência à medida que associa-se a ácidos nucléicos (MOLECULAR PROBES INCORPORATION, 2005) (Figura 6).

Figura 6. Imagens fluorescentes para calceína-AM (A) e etídeo homodímero 1 (B). Barras de escala: 50 μm .



Fonte: arquivo pessoal

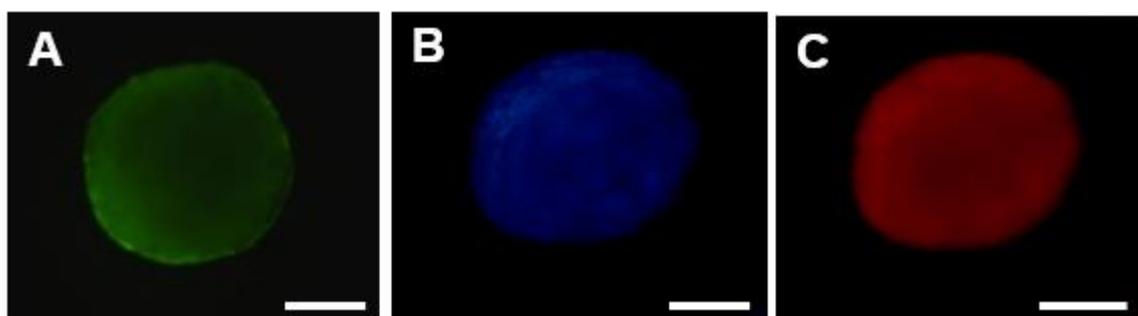
Além da viabilidade, pode-se avaliar o estado oxidativo dos folículos utilizando marcadores fluorescentes como 2', 7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H_2DCFDA) que é um indicador para EROs que difunde-se passivamente para as células onde os seus grupos acetato são clivados por esterases intracelulares e o seu grupo clorometilo tiol-reativo reage com a glutatona intracelular e outros tióis, promovendo uma reação de oxidação e produzindo uma molécula fluorescente de coloração verde no interior da célula. A oxidação destas sondas pode ser detectada por monitorização do aumento da fluorescência com um microscópio de fluorescência, utilizando fontes de excitação

e filtros apropriados para a fluoresceína (FITC) 0,5-8 (MOLECULAR PROBES, 2006; Figura 7A).

Um outro avaliador do estado oxidativo é o 4-clorometil-6.8-difluoro-7-hidroxycumarina (CellTracker® Blue). As sondas fluorescentes do CellTracker® Blue passam livremente através das membranas celulares; No entanto, uma vez dentro da célula são transformadas em produtos de reação de células-impermeabilizante. Essas sondas contêm um grupo clorometilo ou bromometilo, que reage com grupos tiol, utilizando uma reação de GSH-S-transferase-mediada, emitindo uma coloração azul (MOLECULAR PROBES, 2014; Figura 7B).

Pode-se ainda fazer a avaliação do estado energético dos folículos com o marcador fluorescente MitoTracker® Red, que avalia mitocôndrias. Suas sondas celulares permeáveis contêm uma porção clorometil levemente reativo com o tiol que se difundem passivamente através da membrana plasmática e se acumulam nas mitocôndrias ativas emitindo uma coloração vermelha (CELL SIGNALING TECHNOLOGY, 2013; Figura 7C).

Figura 7. Imagens fluorescentes para CellTracker® Blue (A), H₂DCFDA (B) e Mitotracker® Red (C). Barras de escala: 50 µm.

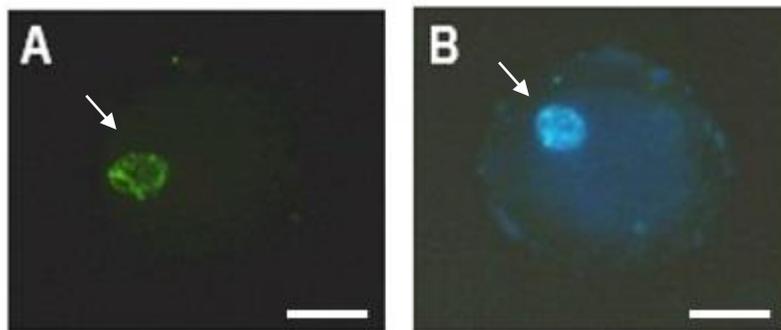


Fonte: arquivo pessoal.

Pela fluorescência também pode ser feita a detecção da apoptose (fragmentação do DNA) usando o ensaio de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling), que é uma enzima que catalisa a adição repetida de mononucleotídeos para o terminal de 3'-OH de um iniciador de DNA, acompanhados pela liberação de fosfato inorgânico. A enzima proporciona, assim, um método único para a rotulagem das extremidades 3' do DNA (PROMEGA CORPORATION, 2013; Figura 8A). Simultaneamente à reação de

TUNEL, pode-se utilizar o Hoechst 33342, um marcador que emite fluorescência azul em 460-490 nm e liga-se preferencialmente às regiões do DNA na ligação entre as bases adenina-timina (A-T). Este marcador é muito usado para corar especificamente os núcleos das células (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2010; Figura 8B).

Figura 8. Imagens fluorescentes demonstrando oócito com marcação para TUNEL (A) e Hoescht 33342 (B). Setas indicam a marcação fluorescente na cromatina. Barras de escala: 50 μm .



Fonte: arquivo pessoal.

2.2. JUSTIFICATIVA

A ovinocultura exerce um importante papel econômico-social na região nordeste, especificamente, no Submédio do Vale do São Francisco, por ser fonte de carne e pele, além de gerar emprego e renda. Entretanto, grande parte dos animais possui baixo índice zootécnico, por isso o desenvolvimento de biotecnologias aplicadas à reprodução animal, é de grande valia. Dentre essas biotécnicas, destaca-se a MOIFOPA que permite a recuperação folicular evitando a sua perda *in vivo*. Sendo assim, os oócitos oriundos de folículos pré-antrais crescidos *in vitro* poderão ser utilizados para maturação e fertilização *in vitro*, transferência de embriões e/ou criopreservação. Entretanto, durante o cultivo pode ocorrer estresse oxidativo, tornando necessária a adição de antioxidantes no meio.

Um das substâncias antioxidantes que pode ser adicionada ao meio de cultivo é a rutina, que atua na prevenção ou redução dos danos induzidos pelas EROs em diferentes tipos celulares. Entretanto, o efeito da rutina sozinha ou associada a outros antioxidantes para avaliar possíveis efeitos anti ou pró-oxidantes no desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais ovinos ainda não foi elucidado. Neste caso, é de extrema importância avaliar o estresse oxidativo, o metabolismo celular e as taxas de apoptose que podem ocorrer *in vitro*.

2.3. Objetivos

2.3.1. Objetivo Geral:

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

2.3.2. Objetivo Específico:

Verificar o efeito de diferentes concentrações (0,1; 1 ou 10 µg/mL) de rutina, utilizada como único antioxidante do meio base ou em associação com as demais substâncias antioxidantes (ácido ascórbico, transferrina e selênio) rotineiramente adicionados ao meio, sobre a morfologia, a formação de antro e o crescimento de folículos secundários ovinos isolados ao longo de 12 dias de cultivo *in vitro*.

Avaliar as taxas de folículos viáveis, de apoptose e os níveis intracelulares de GSH, EROs e mitocôndrias ativas nos grupos de tratamento que mantiverem a morfologia e promoveram maior desenvolvimento folicular após cultivo *in vitro*.

2.4. CAPÍTULO 1

**Rutin can replace the use of three other antioxidants in the culture medium,
maintaining the viability of sheep isolated secondary follicles**

(Rutina pode substituir o uso de três outros antioxidantes no meio de cultivo,
mantendo a viabilidade de folículos secundários isolados ovinos)

T.L.B.G. Lins, A.Y.P. Cavalcante, J.M.S. Santos, V.G. Menezes, V.R.P. Barros, R.S.

Barberino, M.É.S. Bezerra, T.J.S. Macedo, M.H.T. Matos*

Nucleus of Biotechnology Applied to Ovarian Follicle Development, Federal

University of San Francisco Valley, 56300-990, Petrolina-PE, Brazil

Submetido para publicação no periódico **Theriogenology** (Anexo 1)
(Qualis A2 na área de Medicina Veterinária)

Rutina pode substituir o uso de três outros antioxidantes no meio de cultivo, mantendo a viabilidade de folículos secundários isolados ovinos

T.L.B.G. Lins, A.Y.P. Cavalcante, J.M.S. Santos, V.G. Menezes, V.R.P. Barros, R.S.

Barberino, M.É.S. Bezerra, T.J.S. Macedo, M.H.T. Matos*

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

A correspondência deve ser endereçada a:

Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF). Colegiado de Medicina Veterinária - Laboratório de Biologia Celular, Citologia e Histologia. Rodovia BR 407, Km 12, Lote 543 - Projeto de Irrigação Nilo Coelho - S/N, C1. CEP: 56300-990 - Petrolina - PE – Brasil. Tel.: +55.87.2101.4839.

Autor para correspondência: helena.matos@univasf.edu.br (M. H. T. Matos)

Resumo

O presente estudo avaliou o efeito da adição de rutina sozinha ou em combinação com outros antioxidantes (transferrina, selênio e ácido ascórbico) no meio de cultivo, sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos secundários isolados ovinos. Após a coleta dos ovários ovinos, folículos secundários (200-230 μM) foram isolados e cultivados durante 12 dias em Meio Essencial Mínimo ($\alpha\text{-MEM}$) suplementado com BSA, insulina, glutamina e hipoxantina ($\alpha\text{-MEM}$: sem antioxidantes no meio) ou neste mesmo meio também adicionado de transferrina, selênio e ácido ascórbico (AO: meio base com antioxidantes). Além disso, para avaliar o efeito da rutina, diferentes concentrações dessa substância (0,1; 1 ou 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$) foram adicionadas aos diferentes meios de bases ($\alpha\text{-MEM}$ ou AO). Parâmetros como morfologia, formação de antro, taxa de extrusão, diâmetro folicular, taxa de crescimento e oócitos totalmente crescidos (oócitos $\geq 110 \mu\text{m}$) foram analisados. Os tratamentos que tiveram os melhores resultados na morfologia, foram avaliados quanto a viabilidade folicular, apoptose, níveis de glutathiona (GSH), espécies reativas de oxigênio (EROs) e atividade mitocondrial. Após 12 dias, a percentagem de folículos normais foi maior ($P < 0,05$) em $\alpha\text{-MEM} + 0,1 \mu\text{g} / \text{mL}$ de rutina em comparação aos outros tratamentos, exceto em relação ao meio de AO ($P > 0,05$). Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) na taxa de crescimento e diâmetro folicular entre os tratamentos. Além disso, o meio AO e $\alpha\text{-MEM} + 0,1 \mu\text{g} / \text{mL}$ de rutina mostrou ($P > 0,05$) percentagens semelhantes de viabilidade folicular, formação antro, extrusão, oócitos totalmente crescidos, níveis de EROs e mitocôndrias ativas. No entanto, $\alpha\text{-MEM} + 0,1 \mu\text{g} / \text{mL}$ rutina mostrou níveis mais elevados ($P < 0,05$) de GSH do que o meio AO. Em conclusão, $0,1 \mu\text{g} / \text{mL}$ de rutina pode ser usado como o único antioxidante presente no meio de base, e substituir a adição de transferrina, selênio e ácido ascórbico durante o cultivo *in vitro* de folículos secundários ovinos, mantendo a viabilidade folicular e aumentando os níveis de GSH.

Palavras-chaves: Flavonoide, Oócito, Ovino, GSH, Sobrevivência

Introdução

Produção de embriões a partir de oócitos derivados de folículos pré-antrais crescidos *in vitro* ainda é considerado um desafio, uma vez as condições de cultivo *in vitro* podem aumentar espécies reativas de oxigênio (EROs), diminuindo a proteção antioxidante ou causar dano mitocondrial, resultando em taxa de recuperação oocitária e qualidade embrionária menores (AGARWAL et al., 2006; CHAPPEL, 2013; SUCCU et al., 2014). Portanto, a adição de antioxidantes para o meio de cultivo parece ser necessária para prevenir ou diminuir os danos induzidos pelo estresse oxidativo *in vitro* (YUAN et al., 2012; RAJABI-TOUSTANI et al., 2013). Embora diferentes antioxidantes tenham sido rotineiramente adicionados ao meio de base, tais como transferrina, selênio e ácido ascórbico (LUZ et al., 2013; SANTOS et al., 2014), alguns estudos também testaram os efeitos de outras substâncias com potencial antioxidante (GONG; LIM, 2009; TALEBI et al., 2012; SÁ et al., 2016).

Recentemente, os efeitos antioxidantes da rutina têm atraído cada vez mais atenção (MORETTI et al., 2012; CHOI et al., 2014; KAUR; MUTHURAMAN, 2016). A rutina (3,3', 4', 5,7-pentahidroxi-flavona-3-ramnoglicosídeo) é um flavonoide importante, também conhecido como a vitamina P ou quercetina-3-O-rutinosídeo, que é consumido na dieta diária, sendo encontrado em frutas, legumes ou em plantas medicinais (ATANASSOVA; BAGDASSARIAN, 2009; FENG et al., 2015). Pouco se sabe sobre possíveis efeitos da rutina na reprodução. Estudos *in vitro* têm mostrado que a rutina diminui a peroxidação lipídica, os níveis de EROs e fragmentação de DNA em espermatozóides de veados galheiros descongelados após incubação a 37 ° C (MATA-CAMPUZANO et al., 2012) e preserva a viabilidade e a motilidade em espermatozóides humanos (MORETTI et al., 2012). Além disso, a rutina (5 µM) diminui o stress oxidativo em células de ovário de hamster chinês (AHERNE; O' BRIE, 1999). No entanto, não há qualquer informação sobre o efeito da rutina no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos ovinos. Além disso, como substâncias antioxidantes podem atuar como pró-oxidantes, quando utilizadas em excesso (ANDRADE et al., 2010; DELMAS et al., 2011), tem-se a hipótese de que a rutina possa substituir outros antioxidantes adicionados no meio de cultivo.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de rutina como o único antioxidante adicionado ao meio de cultivo de base ou combinada com outros antioxidantes (transferrina, selênio e ácido ascórbico) sobre a morfologia, viabilidade, desenvolvimento, apoptose, marcadores de estresse oxidativo (níveis intracelulares de EROs e GSH) e mitocôndrias metabolicamente ativas de folículos secundários ovinos isolados.

Materiais e Métodos

A menos que indicado, o meio, rutina, suplementos e produtos químicos utilizados no presente estudo foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

Origem e coleta do tecido ovariano

Ovários (n = 180) foram coletados em matadouro local a partir de 90 ovelhas (*Ovis aires*) adultas (1-3 anos de idade) e mestiças. Imediatamente após abate do animal, 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) e suplementado com antibióticos (100 µg/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina). Em seguida, os ovários foram transportados, em um período de 1 h, ao laboratório em tubos contendo MEM-HEPES com antibióticos a 4°C (CHAVES et al., 2008).

Isolamento, seleção e cultivo in vitro de folículo secundários ovinos

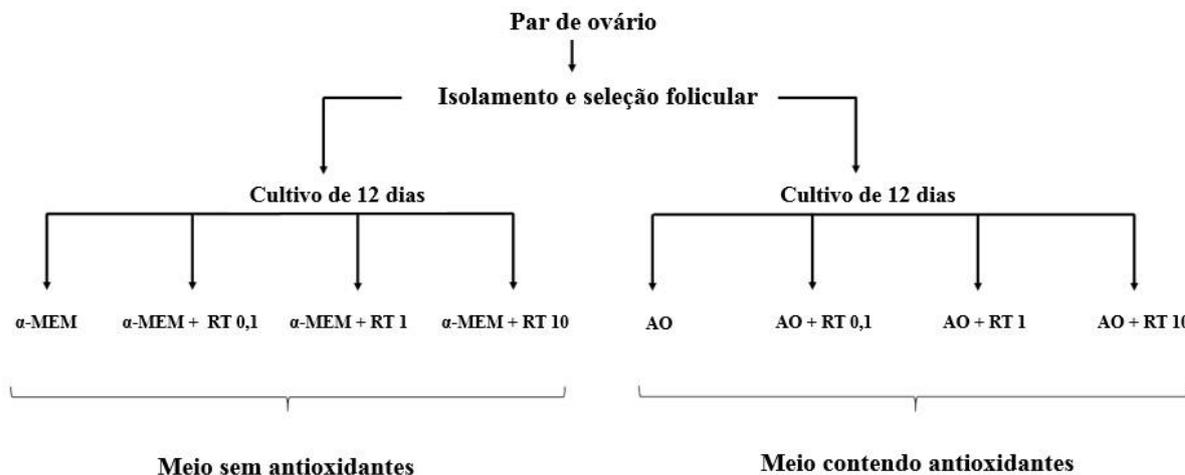
No laboratório, o tecido adiposo circundante e ligamentos foram retirados dos ovários; grandes folículos antrais e corpos lúteos foram removidos. Fragmentos do córtex ovariano (1-2 mm de espessura) foram removidos a partir da superfície do ovário utilizando uma lâmina cirúrgica, sob condições estéreis e, em seguida, colocados em meio que consistia em MEM-HEPES com antibióticos. Folículos secundários de ovelhas, com cerca de 200- 230 µm de diâmetro, sem cavidades antrais, foram visualizados sob um estereomicroscópio (SMZ645 Nikon, Tóquio, Japão) e mecanicamente isolados por microdissecação, utilizando agulhas de

calibre 26 (26 G). Estes folículos foram então transferidos para gotas de 100 µL de meio de cultivo de base para a avaliação da qualidade. Somente folículos que apresentavam as seguintes características foram selecionados para o cultivo: uma membrana basal intacta, duas ou mais camadas de células da granulosa e um oócito visível e saudável, e centralmente localizado dentro do folículo, sem qualquer escurecimento do citoplasma. Os folículos isolados foram reunidos e em seguida distribuídos aleatoriamente entre os grupos de tratamento, com aproximadamente 60 folículos por grupo.

Cultivo in vitro de folículos secundários ovinos (protocolo experimental)

Após a seleção, os folículos foram aleatoriamente divididos em oito grupos de estudo e cultivados individualmente (um folículo por gota) em gotas de 100 µl de meio de cultivo sob óleo mineral em placas de petri (60 x 15 mm, Corning, EUA). O meio de controle de base consistiu em α -MEM (pH 7,2-7,4) suplementado com 3,0 mg / mL de BSA, 10 ng / ml de insulina, glutamina 2 mM e 2 mM de hipoxantina (meio sem antioxidante, chamado α -MEM) ou este mesmo meio adicionado de 5,5 µg / ml de transferrina, 5,0 ng / ml de selênio e 50 ng / ml de ácido ascórbico (meio contendo antioxidantes, referido como AO). Para verificar os efeitos da rutina, o meio de base sem (α -MEM) ou com antioxidante (AO) foi suplementado com diferentes concentrações de rutina (0,1, 1 ou 10 µg / mL) (Fig. 1). Todos os folículos foram cultivadas a 39°C com 5% de CO₂ por 12 dias. A cada dois dias, em todos os tratamentos, realizou-se a troca parcial do meio (60 µl) por meio fresco.

Figura 1 - Protocolo experimental para o cultivo *in vitro* de folículos secundários ovinos em diferentes meios.



Avaliação morfológica e desenvolvimento folicular

Os aspectos morfológicos de todos os folículos pré-antrais foram avaliados a cada 6 dias utilizando uma ocular micrométrica pré-calibrada acoplada em um estereomicroscópio (SMZ 645 Nikon) com aumento de 100x. Foram classificados como folículos morfolologicamente normais apenas os folículos que apresentavam uma membrana basal intacta, com células da granulosa brilhantes e homogêneas, oócito centralizado e a ausência de sinais morfológicos de degeneração. A atresia folicular foi determinada quando observou-se escurecimento do oócito e células do cumulus circundantes, oócitos disformes ou com núcleo picnótico. A ruptura da membrana basal também foi observada e caracterizada como extrusão do oócito. As seguintes características foram analisadas nos folículos considerados morfolologicamente normais: (i) formação de cavidade antral, definida como o surgimento de uma cavidade translúcida visível entre as camadas de células da granulosa, (ii) diâmetro mensurado a partir da membrana basal, que incluiu duas medidas perpendiculares de cada folículo, (iii) aumento no diâmetro, e (iv) taxa de crescimento diário, calculada como o diâmetro de folículos normais no dia 12 menos o diâmetro dos folículos no dia 0, dividido pelos dias de cultivo *in vitro* (12 dias).

Após 12 dias de cultivo, todos os folículos normais foram cuidadosamente e mecanicamente rompidos com agulhas 26 G sob estereomicroscópio para

recuperação de oócitos. A percentagem de oócitos completamente crescidos, ou seja, oócitos com diâmetro $>110 \mu\text{m}$, foi calculada como o número de oócitos de qualidade aceitável ($\geq 110 \mu\text{m}$) recuperados pelo número total de folículos cultivados ($\times 100$).

Avaliação da viabilidade folicular após cultivo

Análises adicionais foram realizadas para uma avaliação mais precisa da qualidade folicular nos tratamentos que obtiveram os melhores resultados após 12 dias de cultivo (meio AO ou α -MEM + RT 0,1). Para marcação fluorescente, folículos vivos/mortos, aproximadamente 20 folículos por grupo de tratamento, foram colocados em gotas de $100 \mu\text{l}$ de tampão fosfato salino (PBS) com $4 \mu\text{M}$ de calceína-AM e $2 \mu\text{M}$ de etídio homodímero-1 (Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha), seguido por incubação a 39°C durante 15 min. Logo após, os folículos foram lavados em PBS e examinados utilizando um microscópio de fluorescência (Nikon E200, Tóquio, Japão) com uma ampliação de 400x. Os sinais fluorescentes emitidos pela calceína-AM e etídio homodímero-1 foram analisados a 450-490 nm. Os folículos foram considerados vivos quando o citoplasma era marcado positivamente com calceína-AM (verde) e mortos se a cromatina celular ficava marcada com etídio homodímero-1 (vermelho).

Detecção de células apoptóticas pela análise de TUNEL

Para avaliar a fragmentação do DNA e a apoptose, no final do cultivo, os oócitos foram submetidos ao ensaio de TUNEL, como previamente descrito (LI et al., 2009). Resumidamente, os oócitos foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% durante 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, os oócitos (aproximadamente, 20 oócitos por grupo de tratamento) foram lavados três vezes em solução de PBS/PVP e armazenados a 4°C em eppendorfs com PBS/PVP até o início do procedimento de TUNEL. Logo após, os oócitos foram incubados em gotas de $100 \mu\text{L}$ de solução permeabilizante [0,1% (v / v) de Triton X-100 em 10 mM de PBS] durante 3 h à temperatura ambiente. Os controles positivo e negativo foram incubados em gotas de $100 \mu\text{L}$ contendo solução de DNase livre RNase (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) a 37°C durante 1 h e lavados 3 vezes

em gotas de PBS/PVP. A análise de TUNEL foi preparada como indicado pelo fabricante (In Situ Cell Detection Kit, Fluorescein: Boehringer Mannheim/Roche Diagnostics Ltd., Indianapolis, EUA). Para este fim, 7,5 µL de enzima DTT e 67,5 µL de solução marcadora contendo trifosfato de 2-desoxiuridina de 5-FITC (FITC-dUTP) foram utilizadas para se obter 75 µL de solução para reação de TUNEL. Os grupos experimentais e o controle positivo foram incubados com 15 µL desta solução durante 1 h a 37°C numa câmara úmida, no escuro. O controle negativo foi incubado com 15 µL da solução marcadora (FITC-dUTP). Os oócitos foram lavados 3 vezes em gotas de PBS/PVP e incubados em gotas de PBS contendo 10 mM de Hoechst 33342 durante 15 minutos à temperatura ambiente, no escuro. Em seguida, os oócitos foram lavados em gotas de PBS/PVP e as lâminas foram preparadas para avaliação usando um microscópio de epifluorescência (Nikon E200, Tóquio, Japão) com uma ampliação de 400x. Os oócitos foram considerados apoptóticos quando sua cromatina apresentava-se marcada com fluorescência verde.

Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo (níveis intracelulares de ROS e GSH) e mitocôndrias metabolicamente ativas

Após o cultivo, os oócitos foram recuperados e os níveis intracelulares de GSH, EROs e a atividade mitocondrial foram mensurados como descrito anteriormente (KWAK et al., 2012; TANABE et al., 2015), com pequenas modificações. Resumidamente, 4-clorometil-6,8-difluoro-7-hidroxycumarina (Invitrogen CellTracker® Blue; CMF₂HC), 2', 7'- diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H2DCFDA; Invitrogen Corporation) e MitoTracker® Red (MitoTracker® Red, CMXRos, Molecular Probes, Melbourne, Victoria, Australia) foram usados para detectar níveis intracelulares de GSH, EROs e atividade mitocondrial, como fluorescência azul, verde e vermelha, respectivamente. Oócitos (aproximadamente, 20 oócitos por grupo de tratamento) foram incubados (no escuro) durante 30 minutos em PBS e 10 mM de CellTracker Blue, 10 mM de H2DCFDA e 100 nM de MitoTracker Red a 37°C. Após a incubação, os oócitos foram lavados com PBS e a fluorescência foi observada sob um microscópio de epifluorescência, com filtros UV (370 nm para GSH, 460 nm for ROS e 579-599 nm para a mitocôndria ativa). Imagens fluorescentes foram salvas em formato de

imagem TIFF e as intensidades da fluorescência dos oócitos foram analisadas usando o software Image J. (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA).

Análise estatística

Os dados de sobrevivência folicular, folículos extrusos, formação de antro e recuperação de oócitos após o cultivo *in vitro* foram expressos em porcentagem e comparados pelo teste do Qui-quadrado. Dados para GSH, EROs e atividade mitocondrial foram submetidos a ANOVA. O diâmetro folicular e taxa de crescimento foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificar a distribuição normal dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Em seguida, foi utilizado o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis para as comparações. Os dados de células apoptóticas (TUNEL) foram submetidos ao teste PLSD Fisher e expressos em porcentagem. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (e.p.) e as diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

Resultados

Morfologia e desenvolvimento folicular após cultivo *in vitro*

Folículos morfologicamente normais apresentavam oócitos centralizados e células da granulosa normais, e circundados por uma membrana basal intacta (Fig. 2A). No dia 6 de cultivo, folículos com uma pequena cavidade antral (Fig. 2B), atresícos (Fig. 2C) e extrusos (Fig. 2D) foram observados. Houve uma diminuição significativa na porcentagem de folículos morfologicamente normais do dia 0 ao dia 6 em todos os tratamentos (Fig. 3). Além disso, no dia 12 de cultivo, a porcentagem de folículos morfologicamente normais foi significativamente maior no α -MEM + 0,1 μ g / mL a rotina (81,6%) em comparação aos outros tratamentos, exceto em relação ao meio AO (74,5%) ($P > 0,05$).

Figura 2 - Folículo secundário morfologicamente normal no dia 12 (A); folículos antrais após 6 dias de cultivo em α -MEM + RT 0,1 (B); atrésico (C) e folículos extrusos após 6 dias de cultura na AO + RT 1 (D). GC: células da granulosa; O: oócito. A seta indica a cavidade antral. Barra de escala: 100 μ m. α -MEM: meio sem antioxidantes; AO: α -MEM contendo antioxidantes e RT: rutina.

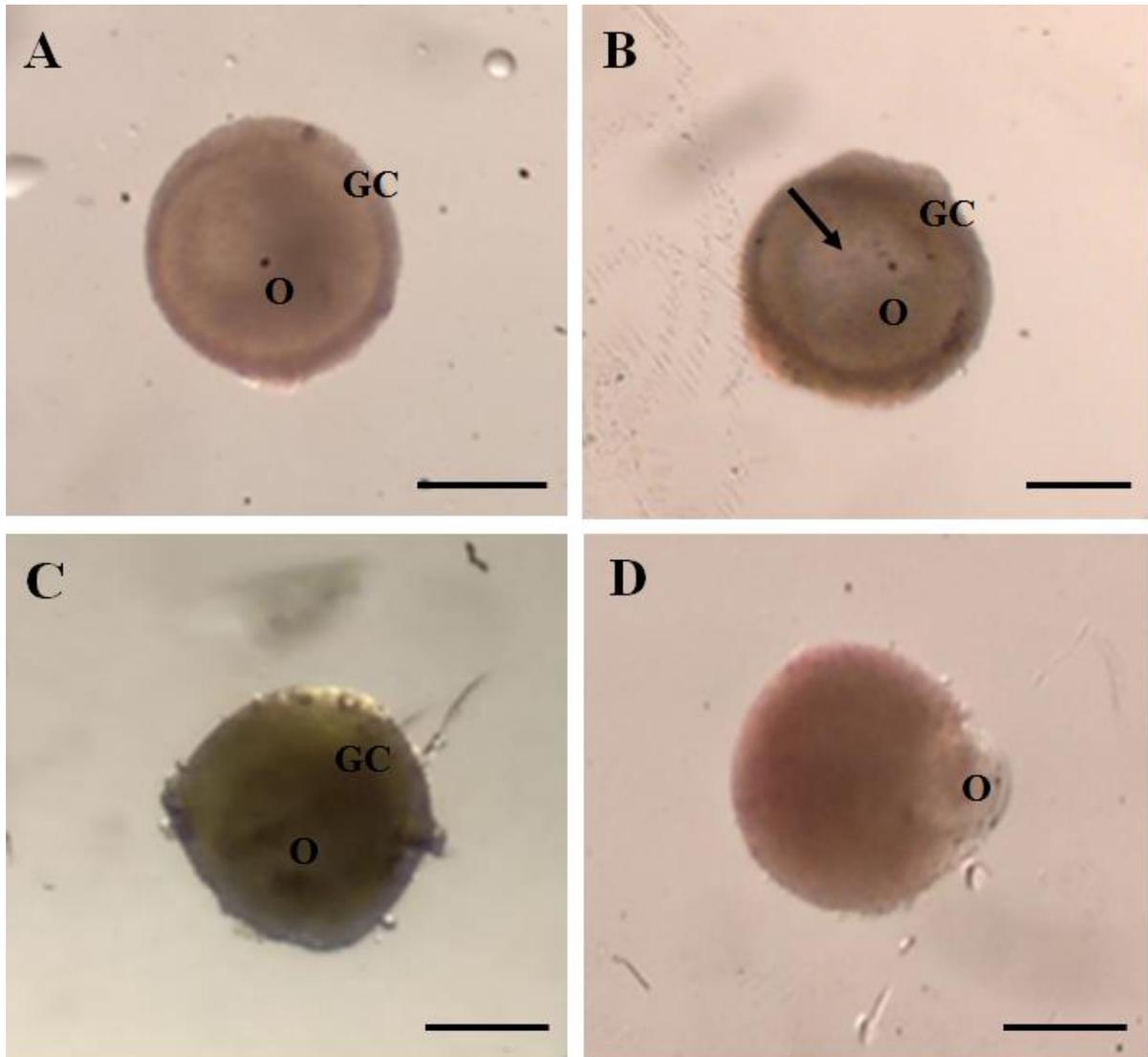
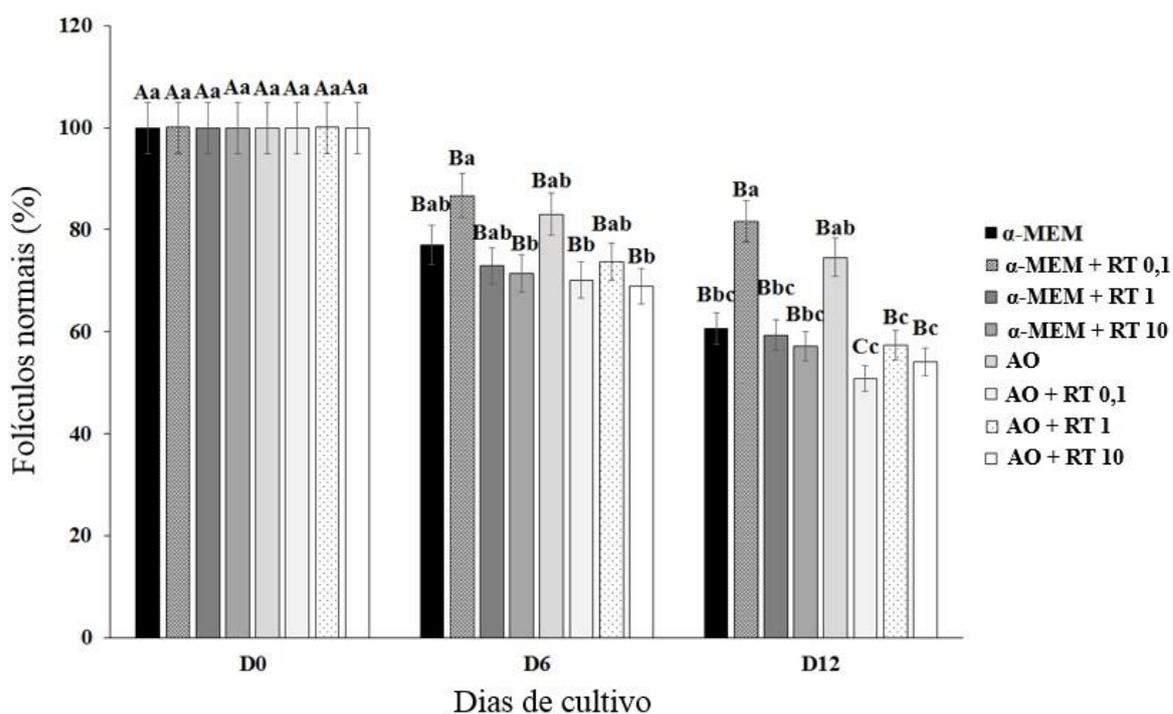


Figura 3 - Percentagens de folículos morfologicamente normais cultivados em diferentes meios adicionados ou não de diferentes concentrações de rutina.

(a, b, c) Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo período ($P < 0,05$); (A, B, C) Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os períodos de cultivo no mesmo tratamento ($P < 0,05$). α -MEM: meio sem antioxidantes ; AO: α -MEM contendo antioxidantes e RT: rutina.



Todos os tratamentos aumentaram significativamente a percentagem de formação de cavidade antral do dia 0 ao dia 6, entretanto, não foi observado aumento ($P > 0,05$) no dia 12 (Fig. 4). No final do cultivo, não houve diferenças significativas entre os meios α -MEM, α -MEM + 0,1 ou 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de rutina, AO, AO adicionado por 1 ou 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de rutina, em relação à formação do antro. Além disso, não foi observado diferenças entre os tratamentos nos parâmetros ($P > 0,05$) extrusão, diâmetro folicular e taxa de crescimento diária entre tratamentos (dados não apresentados). No dia 12, a percentagem de oócitos $\geq 110 \mu\text{m}$ foi semelhante ($P > 0,05$) entre α -MEM + 0,1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de rutina (50%) e meio AO (47,4%) e ambos

foram significativamente mais elevados do que os outros tratamentos, exceto para α -MEM + 10 μ g / mL de rutina (32,1%) e AO + 1 μ g / mL de rutina (32,7%) (Fig. 5).

Figura 4 - Percentagens de formação de antro em folículos cultivados em diferentes meios adicionados ou não de diferentes concentrações de rutina.

(a, b, c) Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo período ($P < 0,05$); (A, B, C) Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os períodos de cultivo no mesmo tratamento ($P < 0,05$). α -MEM: meio sem antioxidantes; AO: α -MEM contendo antioxidantes e RT: rutina.

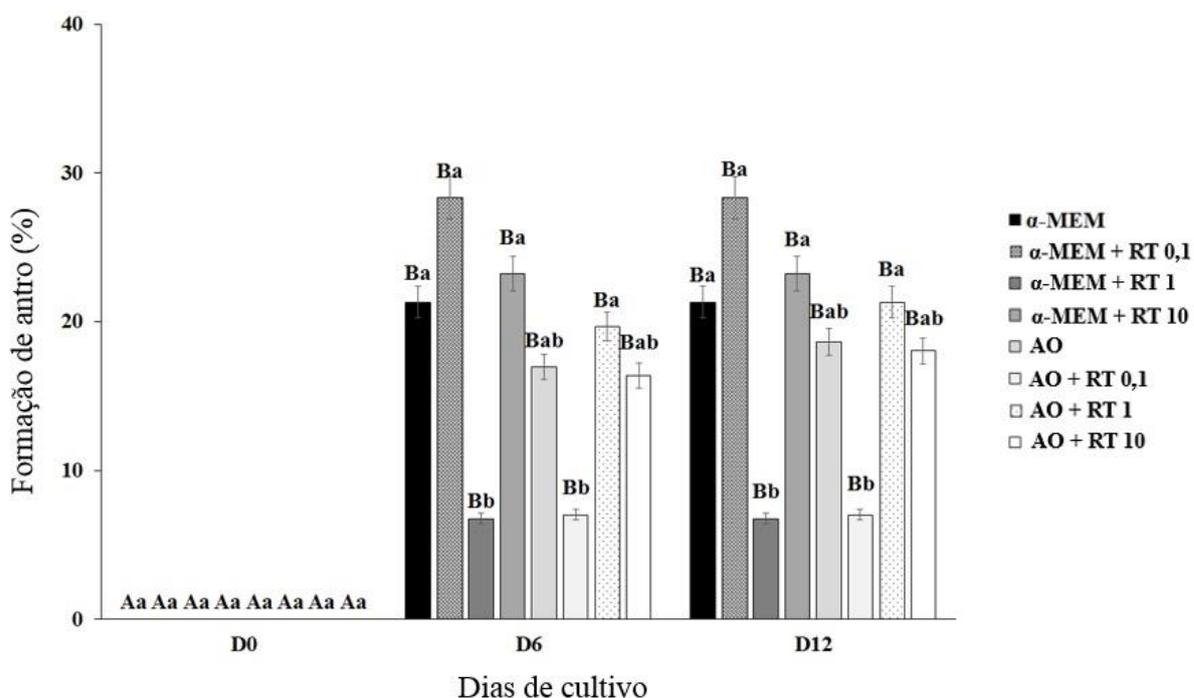
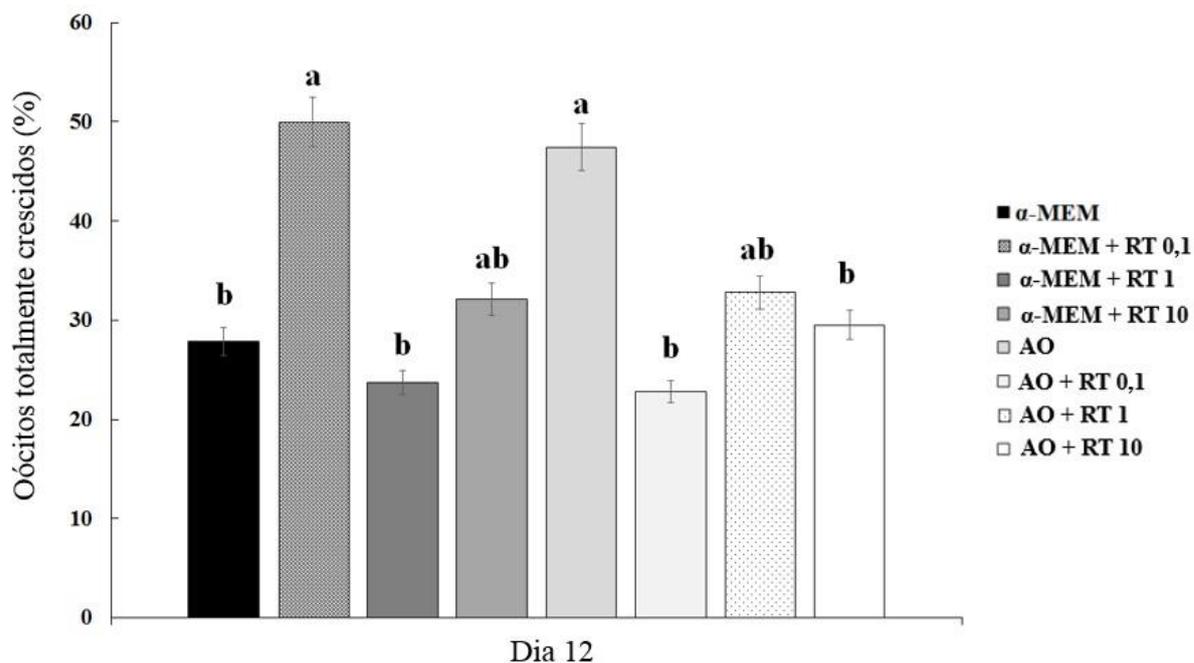


Figura 5 - Percentagens de oócitos totalmente crescidos após cultivo de folículos secundários em diferentes meios adicionados ou não de diferentes concentrações de rutina. (a, b, c) Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo período ($P < 0,05$); α -MEM: meio sem antioxidantes; AO: α -MEM contendo antioxidantes e RT: rutina.



Viabilidade folicular e detecção de apoptose em oócitos após o cultivo in vitro

Com base nos resultados de morfologia, análises adicionais foram realizadas em α -MEM + 0,1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de rutina e AO. No final do cultivo, 73-77% dos folículos eram viáveis (Fig. 6) e não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) entre os dois grupos. A técnica de TUNEL demonstrou a ausência ou muito poucos oócitos apoptóticos após 12 dias de cultivo (Fig. 7A). O controle negativo não apresentou coloração positiva para o TUNEL (dados não mostrados) e todos os oócitos do controle positivo demonstraram marcação positiva para apoptose (Fig. 7C). Todos os oócitos foram marcados com o Hoechst 33342, em azul fluorescente (Fig. 7D-F). Não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) em oócitos TUNEL-positivos entre os tratamentos (oócitos positivos inexistentes para o meio AO e 13,63% de oócitos positivos para α -MEM + 0,1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de rutina).

Figura 6 - Folículo viável após cultivo em α -MEM + RT 0,1 marcado em verde por calceína-AM (A) e folículo degenerado após cultivo em meio AO marcado em vermelho por etídio-homodímero 1 (B). Barras de escalas: 100 μ m. α -MEM: meio sem antioxidante; AO: α -MEM contendo antioxidantes e RT: rutina.

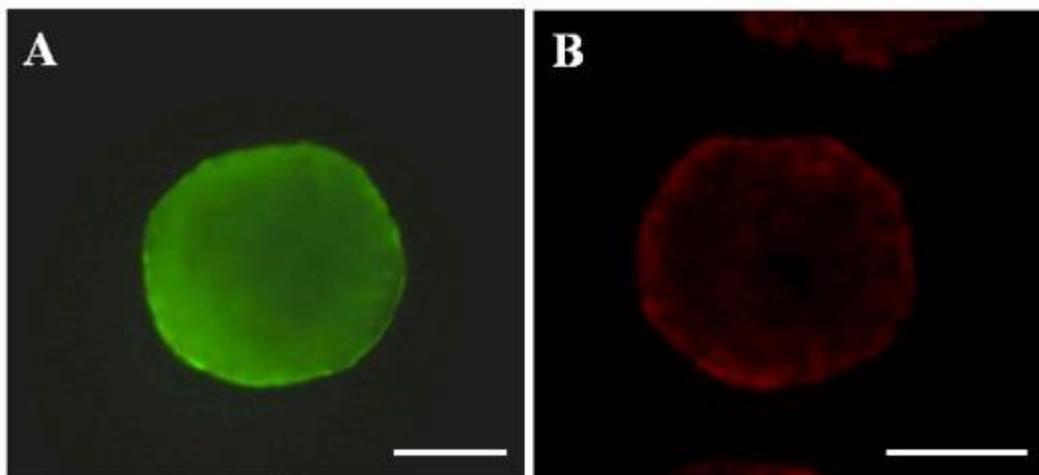
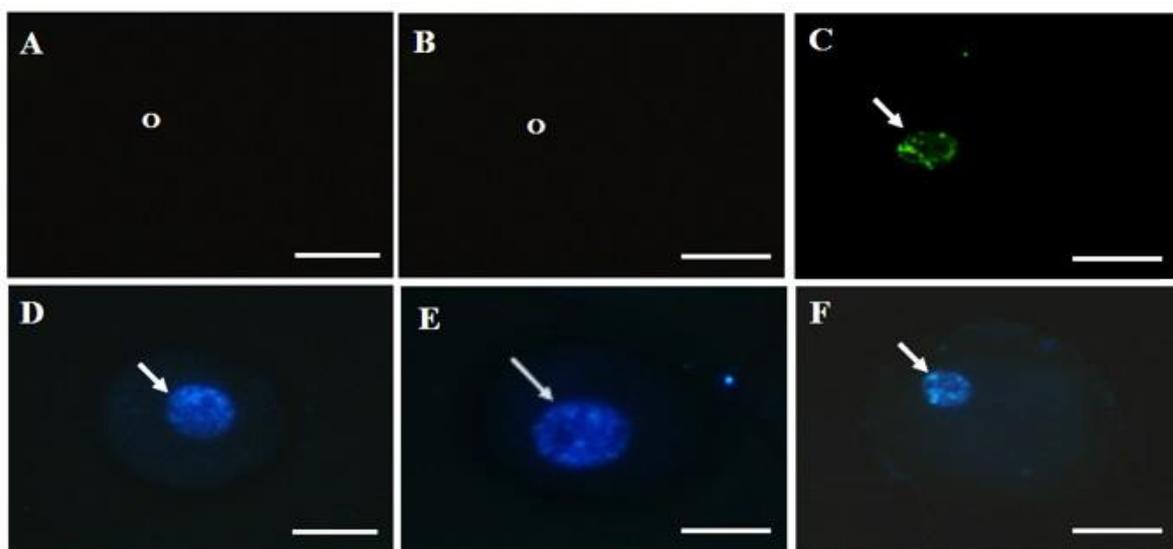


Figura 7 - Fragmentação do DNA em oócitos ovinos após 12 dias de cultivo corados com TÚNEL (A, B, C) e Hoechst 33342 (D, E, F). Oócito normal em meio AO (A e D), α -MEM + RT 0,1 (B e E) e do oócito apoptótico no controle positivo (C e F). Nota-se a fragmentação de DNA, como evidenciado pela cromatina verde na Figura C (controle positivo). O: oócito; As setas demonstram: cromatina nuclear. Barras de escala: 50 μ m. α -MEM: meio sem antioxidante; AO: α -MEM contendo antioxidantes e RT: rutina.

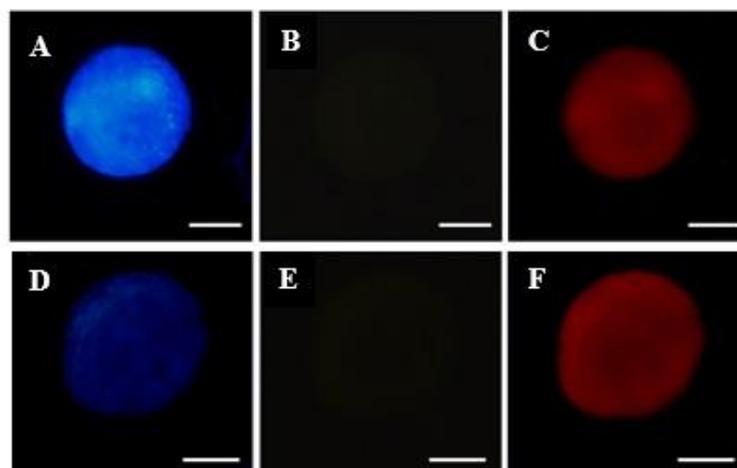


Nível intracelular de GSH, EROs e mitocôndrias ativas

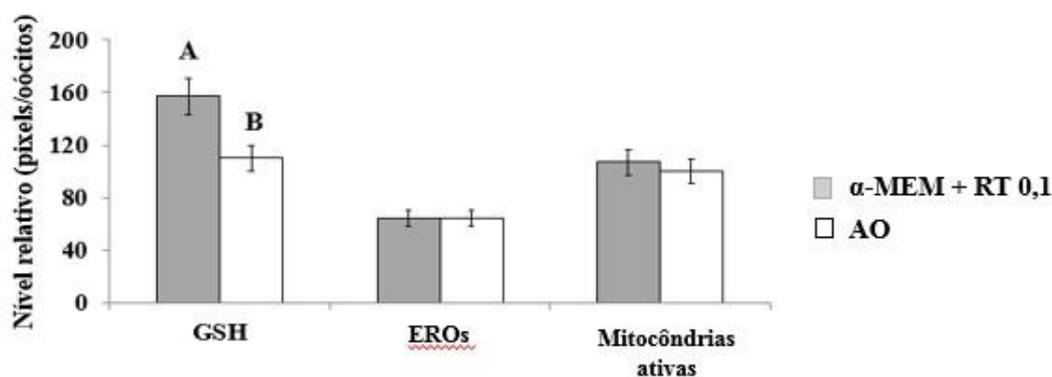
Após 12 dias de cultivo, os oócitos cultivados em α -MEM (sem antioxidantes), suplementado com 0,1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de rutina apresentaram maiores níveis de GSH intracelular do que o meio AO (sem rutina) ($P < 0,05$). Níveis de EROs e mitocôndrias ativas intracelulares foram semelhantes ($P > 0,05$) entre tratamentos (Fig. 8).

Figura 8 - Imagens fotomicrográficas de epifluorescência de oócitos ovinos. (a) Os mesmos oócitos foram marcados em CellTracker Blue (A, D), 2', 7'-diacetato diclorodihidrofluoresceína (B, E) e MitoTracker Red (C, F) para detectar os níveis intracelulares de GSH, EROs e mitocôndrias ativas, respectivamente. Oócitos cultivados em α -MEM + RT 0,1 (A-C) ou AO (D-F); Barras de escala: 50 μm (100x). (b) Níveis intracelulares de GSH, EROs e mitocôndrias ativas em oócitos ovinos após 12 dias de cultivo *in vitro* em meio AO ou em α -MEM + RT 0,1. α -MEM: meio sem antioxidante; AO: α -MEM contendo antioxidantes e RT: rutina. (A, B) Barras com letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

(a)



(b)



Discussão

Este estudo foi o primeiro que demonstrou os efeitos benéficos da rutina no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos. Além de manter a viabilidade e promover o desenvolvimento de folículos secundários ovinos semelhante ao meio de base acrescido de antioxidantes (transferrina, selênio e ácido ascórbico), a rutina (0,1 µg / mL), adicionada como o único antioxidante no meio, melhora os níveis intracelulares de GSH após o cultivo.

Estudos recentes demonstraram que 5,5 µg / ml de transferrina, 5,0 ng / ml de selênio e 50 ng de ácido ascórbico / mL são as respectivas concentrações ótimas para o cultivo *in vitro* de folículos secundários caprinos e ovinos (SÁ *et al.*, 2015; BARBERINO *et al.*, 2015). A transferrina, uma proteína de ligação a metais, e ácido ascórbico, a vitamina C, previnem a formação de radicais hidroxilo, impedindo-os de participação em reações que resultam na formação de EROs. O selênio é uma parte essencial de uma gama de selenioproteínas, incluindo a glutathione peroxidase (GSH-Px), que é responsável pela decomposição de peróxidos, convertendo-os em não-radicais, ou produtos não tóxicos (SE-GSH-Px) (ZIMMERMAN *et al.*, 2015; SURAI *et al.*, 2016). Este mineral também suprime a apoptose em células da granulosa de folículos cultivados *in vitro* (TILLY; TILLY, 1995; YEH *et al.*, 2005). No entanto, no presente estudo, estes três antioxidantes adicionados em conjunto ao meio de base promovem os mesmos efeitos que a rutina sozinha (viabilidade, apoptose, formação do antro). Estudos relatam que a rutina elimina os radicais superóxido e quelos íons metálicos, evitando assim a peroxidação lipídica (OMOLOU *et al.*, 2011). Alguns autores demonstraram que a rutina pode interagir com a cabeça polar dos fosfolipídios, aumentando a rigidez da membrana e conseqüentemente protegendo-as dos danos oxidativos (ERLEJMAN *et al.*, 2004). Por isso, a rutina pode ser eficiente para manter a morfologia de folículos ovarianos ovinos (81,6%) e para inibir a apoptose durante o cultivo.

É digno de nota que o meio sem a adição de antioxidantes (α -MEM) apresentou percentagens de oócitos totalmente crescidos inferior (27,8%) ao meio suplementado com antioxidantes (AO) ou α -MEM adicionado com 0,1 µg / mL de rutina (aproximadamente 50%). Estes resultados demonstram a importância da suplementação do meio base com substâncias antioxidantes para promover um desenvolvimento folicular adequado e, conseqüentemente, maiores taxas de

oócitos totalmente crescidos para promover a maturação *in vitro* (MIV). Além disso, sabe-se que algumas substâncias antioxidantes podem atuar como pró-oxidantes quando usadas em excesso (ANDRADE et al., 2010). Por exemplo, a rutina pode atuar como pró-oxidante porque a presença de O₂ e metais de transição como o ferro e o cobre catalisam os ciclos redox de compostos fenólicos e podem conduzir à formação de EROs e radicais que danificam o DNA, lipídeos e outras moléculas biológicas (GALATI; O'BRIE, 2004; PROCHÁZKOVÁ et al., 2011). Portanto, em nosso estudo, sugerimos que a rutina sozinha pode atuar como um agente pró-oxidante a 1 ou 10 µg / mL ou até mesmo nas concentrações mais baixas (0,1 µg / mL) em combinação com os outros três antioxidantes presentes no meio durante o cultivo *in vitro*, contribuindo para diminuição de folículos morfológicamente normais.

No entanto, em uma concentração adequada, a rutina (0,1 µg / ml) aumentou os níveis de GSH em comparação ao meio de base AO. A GSH é o tiol não proteico mais abundante e o principal tampão redox celular (HATEM et al., 2014). A rutina aumentou os níveis de GSH, porque ela aumenta enzimas que sintetizam a GSH, como a glutathione redutase (GR), a atua também inibindo a depleção de GSH (NAFEES et al., 2015). Além disso, a rutina foi usada como um mediador catalítico para a detecção de GSH, o que demonstra a relação positiva entre a rutina e essa enzima (HUANG et al., 2015). Por outro lado, o selênio regula o pool de reserva de GSH através da glutathione peroxidase (GPX), que é uma enzima dependente de selênio, e esta é responsável pela oxidação da GSH (MAHMOUD; EDENS, 2003). Portanto, parece que o selênio pode aumentar a GPX ao invés da GSH, e esta poderia ser uma razão para a menor expressão de GSH no meio base AO (meio com antioxidantes).

Estudos recentes têm mostrado que a rutina inibiu marcadamente a disfunção mitocondrial em células de espermatozoides submetidos ao stress oxidativo (MATA-CAMPUZANO et al., 2012). Da mesma forma, o selênio previne o dano oxidativo ao DNA mediado por metais (ZIMMERMAN et al., 2015; SURAI et al., 2016). No estudo atual, os níveis de mitocôndrias ativas não diferiu entre os tratamentos, além de que tinham baixos índices ou ausência de oócitos apoptóticos. No entanto, os níveis de EROs também não diferiram entre os tratamentos. É importante mencionar que atualmente as EROs não são mais consideradas apenas subprodutos tóxicos da respiração mitocondrial, mas que também desempenham importante papel na regulação de diversas vias de

sinalização celular (RECZEK; CHANDEL, 2015). Portanto, sugerimos que o nível de EROs observado no presente estudo pode ser considerado normal a nível celular e em equilíbrio com sistema antioxidante de defesa.

Finalmente, não foi observado nenhum efeito da rutina sobre o crescimento folicular, pois por ser um antioxidante, ela atua diretamente na sobrevivência e não necessariamente no crescimento folicular, o qual é estimulado pelo FSH. A rutina também não exerceu efeito sobre a formação da cavidade antral. Sabe-se que após a formação do antro, o folículo se torna dependente de FSH (ERICKSON; SHIMASAKI, 2001), o que sugere que o uso de FSH no meio de cultivo de base associado a um aumento no período de cultivo pode ser necessário para dar suporte tanto ao crescimento como a formação do antro em folículos secundários cultivados *in vitro*.

Em conclusão, a rutina, na concentração de 0,1 µg / mL, pode ser utilizada como o único antioxidante presente no meio de base, substituindo a adição de transferrina, selênio e ácido ascórbico durante o cultivo *in vitro* de folículos secundários ovinos por 12 dias, mantendo a viabilidade folicular e aumentando os níveis de GSH. Mais estudos com a rutina sozinha ou associada a hormônios e/ou fatores de crescimento são necessários no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais.

Agradecimentos

T. L. B. G. Lins recebe uma bolsa de estudos da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE, Brasil). M. H. T. Matos é apoiada pelo CNPq pela concessão de uma bolsa (310712 / 2015-7).

REFERÊNCIAS

ABEDELAAHI, A. et al. Sodium selenite improves the in vitro follicular development by reducing the reactive oxygen species level and increasing the total antioxidant capacity and glutathione peroxidase activity. **Hum Reprod**, v. 25, p. 977–85, 2010.

ABIR, R. et al. Turner's syndrome and fertility: Current status and possible future. *Propects. Human Reprod.* v. 7, p. 603-610, 2001.

ADHIKARI, D. et al. Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. **Hum Mol Gen**, v. 19 p. 397–410, 2010.

AHERNE, S. A.; O' BRIE NM. The flavonoids, myricetin, quercetin and rutin, protect against cholestan-3 β , 5 α , 6 β -triol - induced toxicity in Chinese hamster ovary cells in vitro. **Nutr Res**, v. 19 (5), p. 749-760, 1999.

AGARWAL, A. et al. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. **Fertil Steril**, v. 86, p. 503-512, 2006.

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

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artmed; 2010.

ALMEIDA, A. P. et al. Effect of sequential medium with fibroblast growth factor-10 and follicle stimulating hormone on in vitro development of goat preantral follicles. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 152 p. 32–8, 2015.

AMSTERDAM, A. et al. Alternative pathways of ovarian apoptosis: death for life. **Bio. Pharml**, v. 66, p. 1355-1362, 2003.

ANDRADE, E.R. et al. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 34, p.79-85, 2010.

ANDRADE, P. M. et al. Effects of a-MEM and TCM-199 culture media and epidermal growth factor on survival and growth of goat and sheep preantral follicles cultured in vitro. **Anim. Reprod.**, v. 11 p. 567–72, 2014.

ARAÚJO, V. R. et al. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v. 12, p. 1-14, 2014.

ARAÚJO, V. R. et al. Long-term in vitro culture of bovine preantral follicles: Effect of base medium and medium replacement methods. **Anim Reprod Sci**, v. 161, p. 23-31, 2015.

ARAÚJO, V. R. et al. Bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) induces atresia in goat primordial follicles cultured in vitro. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 30, p. 770–6, 2010.

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

ATANASSOVA, M.; BAGDASSARIAN, V. Rutin content in plant products. **Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy**, v. 44, p. 201-203, 2009.

BAO, R. M. et al. FOXO3 knockdown accelerates development of bovine primordial follicles. **J Reprod. Dev.**, v. 57 p. 475–80, 2011.

BARBONI, B. et al. In vitro grown sheep preantral follicles yield oocytes with normal nuclear-epigenetic maturation. **PLoS one**, v. 6 (11), 2011, e27550.
doi:10.1371/journal.pone.0027550.

BARNETT, K. R. et al. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. **Human Reprod Update**, v. 12, p. 537-55, 2006.

BARREIROS, A. L.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29 (1), p. 113–123, 2006.

BARBERINO, R. S. et al. *Amburana cearensis* leaf extract maintains survival and promotes in vitro development of ovine secondary follicles. **Zygote**, v. 24, p. 1-9, 2015.

BASINI, G.; TAMANINI, C. Selenium stimulates estradiol production in bovine granulosa cells: Possible involvement of nitric oxide. **Domest Anim Endocrinol**, v. 18 p. 1–17, 2000.

BEATTIE, D. S. Bioenergética e metabolismo oxidativo. **Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas**. 6ª ed., São Paulo, 2007, 521–568 p.

BEHRMAN, H. R. et al. Oxidative stress and the ovary. **J Soc Gynecol Investig**, v. 8, p. 40-42, 2001.

BERTOLDO, M. J. et al. Effects of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) supplementation during culture of the sheep ovarian cortex. **Anim Reprod Sci**, v. 149, p. 124–34, 2014.

BLIER, P. U.; DUFRESNE, F.; BURTON, R. S. Natural selection and the evolution of mtDNA-encoded peptides: evidence for intergenomic co-adaptation. **Trends Genet**, v.17, p. 400-406, 2001.

BROMFIELD, J. J.; SHELDON, I.M. Lipopolysaccharide reduces the primordial follicle pool in the bovine ovarian cortex ex vivo and in the murine ovary in vivo. **Biol Reprod**, v. 88:98, p. 1-9, 2013.

BRUNO, J. B. et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor in goat ovaries and improvement of in vitro caprine preantral follicle survival and growth with VEGF. **Reprod Fertil Dev**, v. 21 p. 679–87, 2009.

BRUNO, J. B. et al. Vasoactive intestinal peptide improves the survival and development of caprine preantral follicles after in vitro tissue culture. **Cells Tissues Organs**, v. 191, p. 414–21, 2010.

CAMBONI, A. et al. Alginate beads as a tool to handle, cryopreserve and culture isolated human primordial/primary follicles. **Cryobiology**, v. 67, p. 64–69, 2013.

CAVALCANTE, A. Y. et al. Kit ligand promotes the transition from primordial to primary follicles after *in vitro* culture of ovine ovarian tissue. **Zygote**, v. 24, p. 1-5, 2015.

CELESTINO, J. J. et al. Steady-state level of kit ligand mRNA in goat ovaries and the role of kit ligand in preantral follicle survival and growth in vitro. **Mol Reprod Dev**, v. 77, p. 231–40, 2010.

CELESTINO, J. J. H. et al. Recombinant epidermal growth factor maintains follicular ultrastructure and promotes the transition to primary follicles in caprine ovarian tissue cultured *in vitro*. **Reprod Sci**, v. 16, p. 239-246, 2009.

CELESTINO, J. J. et al. Steady-state level of bone morphogenetic protein-15 in goat ovaries and its influence on *in vitro* development and survival of preantral follicles. **Mol Cell Endocrinol**, v. 338, p. 1–9, 2011.

CELL SIGNALING TECHNOLOGY. MitoTracker® Red CMXRos is well retained after fixation allowing for further sample processing and immunostaining, 2013.

CHAVES, R. N. et al. Fibroblast growth factor-10 maintains the survival and promotes the growth of cultured goat preantral follicles. **Domest Anim Endocrinol**, v. 39 p. 249–58, 2010.

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

CHAPPEL, S. The role of mitochondria from mature oocyte to viable blastocyst. **Obstet Gynecol Int**, v. 2013, p. 1-10, 2013.

CHEN, H. et al. Identification of Novel Markers of Mouse Fetal Ovary Development. **PlosOne**, v. 7, p. 1-15, 2012.

CHEN, Q. et al. Cross-talk between fas/fas ligand system and nitric oxide in the pathway subserving granulosa cell apoptosis: a possible regulatory mechanism for ovarian follicle atresia. **Endocrinology**, v.146, p.808-815, 2005.

CHOI, K. S. et al. Rutin inhibits UVB radiation-induced expression of COX-2 and iNOS in hairless mouse skin: p38 MAP kinase and JNK as potential targets. **Arch Biochem Biophys**, v. 8, p. 38-45, 2014.

DAKUBO, G. The role of mitochondrial reactive oxygen species in cancer. **Mitochondrial genetics and cancer**, p. 237-256, 2010.

DELMAS, D. et al. Transport, stability, and biological activity of resveratrol. **Ann NY Acad Sci**, v. 1215 p. 48-59, 2011.

DEMESTERE, I. et al. Impact of various endocrine and paracrine factors on *in vitro* culture of preantral follicles in rodents. **Reproduction**, v.130, p.147–156, 2005.

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

DHANYA, R. et al. Rutin and quercetin enhance glucose uptake in L6 myotubes under oxidative stress induced by tertiary butyl hydrogen peroxide. **Food Chemistry**, v. 9, p. 546-554, 2014.

DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 55, p. 1211-1239, 2001.

DOWLING, D. K; SIMMONS, L. W. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. **Proc R Soc Lond B**, v.276, p.1737-1745, 2009.

EDSON, M. A.; NAGARAJA, A. K.; MATZUK, M. M. The mammalian ovary from genesis to revelation. **Endocr Rev**, v. 30, p. 624–712, 2009.

ERICKSON, G. F.; SHIMASAKI, S. The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. **Fertil Steril**, v. 76, p. 943-949, 2001.

ERLEJMAN, A. G. et al. “The interaction of flavonoids with membranes: potential determinant of flavonoid antioxidant effects,” **Free Radic Res**, v. 38, p. 1311–1320, 2004.

FAUSTINO, L. R. et al. Interaction between keratinocyte growth factor-1 and kit ligand on the goat preantral follicles cultured *in vitro*. **Small Rumin Res**, v. 114, p. 112–9, 2013.

FENG, R. et al. Extraction and antioxidant activity of flavonoids of *Morus nigra*. **Int J Clin Exp Med**, v. 8(12), p. 22328-22336, 2015.

FERREIRA, I.; ABREU, R. Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. **Sociedade Portuguesa de Bioanalistas da Saúde**, 32–39, 2007.

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.

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. Cryopreservation and in vitro culture of caprine preantral follicles. **Reprod Fertil Dev**. v. 23, p. 40-47, 2011.

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

GALATI, G.; O'BRIEN, P. J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties. **Free Radic Biol Med**, v. 37, p. 287-303, 2004.

GERSHON, E.; PLAKS, V.; DEKEL, N. Gap junctions in the ovary: expression, localization and function. **Mol Cell Endocrinol**, v. 282 (1-2), p. 18–25, 2008.

GIGLI, I. et al. Evidence for a role for anti-mullerian hormone in the suppression of follicle activation in mouse ovaries and bovine ovarian cortex grafted beneath the chick chorioallantoic membrane. **Mol Reprod Dev**, v. 71, p. 480–8, 2005.

GILBERT, I. Impact of the LH surge on granulosa cell transcript levels as markers of oocyte developmental competence in cattle. **Reproduction**, v. 143, p. 735–47, 2012.

GOUGEON, A. Human ovarian follicular development: from activation of resting follicles to preovulatory maturation. **Ann Endocrinol (Paris)**. v. 71, p.132-43, 2010.

GOUVEIA, B. B. et al. Supplemented base medium containing *Amburana cearensis* associated with FSH improves *in vitro* development of isolated goat preantral follicles. **Theriogenology**, v. 86, p. 1275-1284, 2016.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Roca; 2008.

GONÇALVES, R. J. S. **Efeito de diferentes meios e períodos para conservação de ovários caprinos e ovinos sobre a morfologia, a apoptose e o crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais**. 2012. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, Petrolina, 2012.

GONG, S. P.; LIM, J. M. Effects of β -Mercaptoethanol on the Growth of Preantral Follicles and the Maturation of Intrafollicular Oocytes. Asian-Aust. **J Anim Sci**, v. 22, p. 35 – 41, 2009.

GREEN, L. J.; SHIKANOV, A. In vitro culture methods of preantral follicles. **Theriogenology**, v. 86, p. 229-238, 2016.

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

GUPTA, P. S. P. et al. Production of buffalo embryos using oocytes from *in vitro* grown preantral follicles. **Zygote**, v. 16, p. 57-63, 2008.

GÜRGEN, S. G. et al. Chemoprotective effect of ascorbic acid, α -tocopherol, and selenium on cyclophosphamide-induced toxicity in the rat ovary. **Nutrition**, v. 29, p. 777–784, 2013.

HATEM, E. et al. Glutathione is essential to preserve nuclear function and cell survival under oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v. 67, p. 103–114, 2014.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D. J. Flavonoids antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The journal of nutritional biochemistry**, v. 13, p. 572-584, 2002.

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

HENNET, M. L.; COMBELLES, C.M. The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. **Int J Dev Biol**, v. 56, p. 819-31, 2012.

HUANG, Y.; YAN, H.; TONG, Y. Electrocatalytic determination of Reduced Glutathione using rutin as a mediator at acetylene black spiked carbon paste electrode. **J Electroanal Chem**, v. 743, p. 25-30, 2015.

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

HUTT, K. J.; ALBERTINI, D.F. An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. **Reprod Biomed Online**, v. 14, p. 758-764, 2007.

JAIN, Y. T. et al. Follicle-stimulating hormone–induced rescue of cumulus cell apoptosis and enhanced development ability of buffalo oocytes. **Domest Anim Endocrinol**, v. 55, p. 74–82, 2016.

JANG, J. W. et al. Rutin improves functional outcome via reducing the elevated matrix metalloproteinase-9 level in a photothrombotic focal ischemic model of rats. **J Neurol Sci**. v. 6, p. 75-80, 2014.

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

JOHN, G. B. et al. Foxo3 is a PI3K dependent molecular switch controlling the initiation of oocyte growth. **Dev Biol**, v. 32, p. 197–204, 2008.

KAUR, S.; MUTHURAMAN, A. Therapeutic evaluation of rutin in two-kidney one-clip model of renovascular hypertension in rat. **Life Sciences**, v. 150, p. 89-94, 2016.

KERE, M. et al. Ascorbic acid improves the developmental competence of porcine oocytes after parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transplantation. **J Reprod Deve**, v. 59, p. 78-84, 2013.

KRISHNAMURTHY, P.; WADHWANI, A. Antioxidant Enzymes and Human Health, Antioxidant Enzyme, Prof. Mohammed Amr El-Missiry (Ed.), **InTech**, 2012. DOI: 10.5772/48109. Available from: <http://www.intechopen.com/books/antioxidant-enzyme/antioxidant-enzymes-and-human-health>

KULBACKA, J. et al. Apoptosis, Free Radicals and Antioxidant Defense in Antitumor Therapy, Antioxidant Enzyme, Prof. Mohammed Amr El-Missiry (Ed.), **InTech**, 2012. DOI: 10.5772/50357. Available from: <http://www.intechopen.com/books/antioxidant-enzyme/apoptosis-free-radicals-and-antioxidant-defense-in-antitumor-therapy>

KWAK, S. 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.

LEITÃO, C. C. F. et al. Importância dos fatores de crescimento locais na regulação da foliculogênese ovariana em mamíferos. **Acta Sci Vet**, v. 37, p. 215–24, 2009.

LESSER, M. N. R.; KEEN, C. L.; LANOUE, L. Reproductive and developmental outcomes, and influence on maternal and offspring tissue mineral concentrations, of (-)-epicatechin, (+)-catechin, and rutin ingestion prior to, and during pregnancy and lactation in C57BL/6J mice. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 443–449, 2015.

Li, H. J. et al. Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocytes. **Anim Reprod Sci**, v. 114: p. 89–98, 2009.

LI, M. X.; DEWSON, G. Mitochondria and apoptosis: emerging concepts. **F1000prime Reports**, 7:42, 2015. Doi:10.12703/P7-42.

LIMA, I. M. et al. BMPRII and BMPRII mRNA expression levels in goat ovarian follicles and the in vitro effects of BMP-15 on preantral follicle development. **Cell Tissue Res**, v. 348, p. 225–38, 2012.

LIMA, R. T. et al. MicroRNA regulation of core apoptosis pathways in cancer. **Eur. J. Cancer**, v. 47, n. 2, p. 163-174, 2011.

LIMA-VERDE, I. B., et al. Effects of α -tocopherol and ternatin antioxidants on morphology and activation. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, n.1, p.57-65, 2009.

LIMA-VERDE, I. B. et al. Interaction between estradiol and follicle stimulating hormone promotes in vitro survival and development of caprine preantral follicles. **Cells Tissues Organs**, v. 191, p. 240–7, 2010.

LIMA-VERDE, I. B. et al. Progesterone and follicle stimulating hormone interact and promote goat preantral follicles survival and development in vitro. **Pesq Vet Bras**, v. 32, p. 361–7, 2012.

LIU, L. et al. Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase-3 by soluble kit ligand in mouse oocytes during early follicular development. **J Mol Endocrinol**, v. 38, p. 137–46, 2007.

LOPES, C. A. P. et al. Short-term preservation of canine preantral follicles: Effects of temperature, medium and time. **Anim Reprod Sci**, v. 115, p. 201-214, 2009.

LUCCI, C. M. et al. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. **Small Rumin Res**, v. 41, p. 61-69, 2001.

LUZ, V. B. et al. Kit ligand and insulin-like growth factor I affect the in vitro development of ovine preantral follicles. **Small Rumin Res**, v. 115, p. 99–102, 2013.

MAGALHÃES-PADILHA, D. M. et al. In vitro production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. **Theriogenology**, v. 75, p. 182–8, 2011.

MAHMOUD, K.; EDENS, F. Influence of selenium sources on age-related and mild heat stress-related changes of blood and liver glutathione redox cycle in broiler chickens (*Gallus domesticus*). **Comp Biochem Physiol B**, v. 136: p. 921–934, 2003.

MARTINS, F. S. et al. Growth and differentiation factor-9 stimulates activation of goat primordial follicle in vitro and their progression to secondary follicles. **Reprod Fertil Dev**, v. 20, p. 916–24, 2008.

MARTINS, F. S. et al. Expression of protein and mRNA encoding insulin growth factor-I (IGF-I) in goat ovarian follicles and the influence of IGF-I on in vitro development and survival of caprine preantral follicles. **Anim Reprod**, v. 7, p. 349–61, 2010.

MARTINS, F. S. et al. Presence of growth hormone receptor (GH-R) mRNA and protein in goat ovarian follicles and improvement of in vitro preantral follicle survival and development with GH. **Theriogenology**, v. 82, p. 27–35, 2014.

MATA-CAMPUZANO, M. et al. Effect of several antioxidants on thawed ram spermatozoa submitted to 37 °C up to 4 h. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 47 (6), p. 907-14, 2012.

MATOS, M. H. T. et al. Effects of fibroblast growth factor-2 on the in vitro culture of caprine preantral follicles. **Cells Tissues Organs**, v. 186, p. 112–20, 2007a.

MATOS, M. H. T. et al. Técnicas para avaliação da qualidade de folículos ovarianos pré-antrais cultivados *in vitro*. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v. 31, p. 433-442, 2007b.

MATSUDA, F. et al. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. **J Reprod Dev**, v. 58, p. 44-50, 2012.

McCULLY, J. D. et al. Differential contribution of necrosis and apoptosis in myocardial ischemia reperfusion injury. **Am J Physiol - Heart Circulation Physiology**, v. 286, p. 1923-1935, 2004.

MCNATTY, K. P. et al. Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. **Mol Cell Endocrinol**, v. 163 (1/2), p. 11-20, 2000.

MENG, L. et al. Dietary-induced chronic hypothyroidism negatively affects rat follicular development and ovulation rate and is associated with oxidative stress. **Biol reprod**, v. 94 (4), p. 1-11, 2016.

MOLECULAR PROBES INCORPORATION. **LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit *for mammalian cells***. Invitrogen, Ltd. EUA, 2005.

MOLECULAR PROBES. **Reactive Oxygen Species (ROS) Detection Reagents**. Invitrogen, Ltd. EUA, 2006.

MOLECULAR PROBES. **Cell Tracker™ fluorescent probes**. Life technologies. EUA, 2014.

MONIRUZZAMAN, M.; MIYANO, T. Growth of primordial oocytes in neonatal and adult mammals. **J Reprod Dev**, v. 56 (6), p. 559-566, 2010.

MONIRUZZAMAN, M. et al. Knockdown of FOXO3 induces primordial oocyte activation in pigs. **Reproduction**, v. 139, p. 337–348, 2010.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Básica**. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

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

NAFEES, S. et al. Rutin ameliorates cyclophosphamide induced oxidative stress and inflammation in Wistar rats: Role of NFjB/MAPK pathway. **Chem Biol Interact**, v. 23, p. 98–107, 2015.

NARKWICHEAN, A. et al. Effects of dehydroepiandrosterone on in vivo ovine follicular development. **Hum Reprod**, v. 29, p. 146–54, 2014.

NÓBREGA, J.R. et al. Leukemia inhibitory factor stimulates the transition of primordial to primary follicle and supports the goat primordial follicle viability in vitro. **Zygote**, v. 20, p. 73–8, 2012.

OKTEM, O.; URMAN, B. Understanding follicle growth in vivo. **Hum Reprod**, v. 25, p. 2944-54, 2010.

OLIVEIRA, C. A. et al. Functional photostability and cutaneous compatibility of bioactive UVA sun care products. **J Photochem Photobiol B**, v.148, p. 154-159, 2015.

OMOLOU, P. A.; ROCHA, J. B. T.; KADE, I. J. Attachment of rhamnosyl glucoside on quercetin confers potent iron-chelating ability on its antioxidant properties. **Exp Toxicol Pathol**, v. 63, p. 249–255, 2011.

PALMA, G. A. et al. Review Article: Biology and Biotechnology of Follicle Development. **Sci World J**, v. 14, p. 1-14, 2012.

PAZOKI, H. et al. Comparing the growth and the development of mouse pre-antral follicle in medium with PL (Platelet Lysate) and with FBS. **Middle East Fertil Soc J**, v. 20, p. 231-236, 2015.

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

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **J Nat Prod**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

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

PROMEGA CORPORATION. **Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, Recombinant**. EUA, 2013.

RAJABI-TOUSTANI, R. et al. Effect of Papaver rhoeas L. extract on in vitro maturation of sheep oocytes. **Small Rumin Res**, v. 114, p. 146–151, 2013.

RECZEK, C.R.; CHANDEL, N.S. ROS-dependent signal transduction. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 33:p. 8-13, 2015.

REDDY, P. et al. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. **Science**, v. 319, p. 611–3, 2008.

RODGERS, R. J.; IRVING RODGERS, H. F. Morphological classification of bovine ovarian follicles. **Reproduction**, v. 139, p. 309–18.32, 2010.

RODRIGUES, G. Q. et al. Transforming growth factor- β (tgf- β) maintains follicular ultrastructure and stimulates preantral follicle growth in caprine ovarian tissue cultured in vitro. **Arq bras med vet zootec**, v. 66, p. 411–6, 2014.

RUPNARAIN, C. et al. Colon cancer: genetics and apoptotic events. **Biol Chem**, v. 385, p. 449-64, 2004.

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

SÁ, N.A.R. et al. Anethole improves the in vitro development of isolated caprine secondary follicles. **Theriogenology**, 2016. Doi: 10.1016/j.theriogenology.12.014.

SAIKUMAR, P.; VENKATACHALAM, M. A. **Apoptosis**. In J. Rudner (Ed.), *Apoptosis*, p. 29–40, 2013.

SANTIQUET, N.; ROBERT, C.; RICHARD, F. J. The dynamics of connexin expression, degradation, and localization are regulated by gonadotropins during the early stages of *in vitro* maturation of swine oocytes. **PlosOne**, v. 8 (7), p.1–11, 2013.

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

SANTOS, L. P. et al. Protein localization of epidermal growth factor in sheep ovaries and improvement of follicle survival and antrum formation in vitro. **Reprod Dom Anim**, v. 49, p. 783–789, 2014.

SARAIVA, M.V.A. et al. Expression of follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) in goat ovarian follicles and the impact of sequential culture medium on in vitro development of caprine preantral follicles. **Zygote**, v.19: p, 205–14, 2011.

SHEN, S.C.; KO, C.H.; TSENG, S.W. Structurally related antitumor effects of flavanones in vitro and in vivo: involvement of caspase 3 activation, p21 gene expression, and reactive oxygen species production. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.197, p.84-95, 2004.

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. 1691–704, 2004.

SILVA, J. R. V. et al. The activin-follistatin system and in vitro early follicle development in goats. **J Endocrinol**, v.189, p.113–25, 2006.

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

SILVA, W.; FERRARI, C. K. B. Metabolismo Mitocondrial, Radicais Livres e Envelhecimento. **Rev Bras Geriatr Gerontol**, v. 14 (3), p. 441–451, 2011.

SONG, K. et al. Rutin attenuates ethanol-induced neurotoxicity in hippocampal neuronal cells by increasing aldehyde dehydrogenase 2. **Food Chem Toxicol**, v. 6, p. 228-233, 2014.

STEFANSON, A. M.; BAKOVIC, M. Dietary Regulation of Keap1/Nrf2/ARE Pathway: Focus on Plant-Derived Compounds and Trace Minerals. **Nutrients**, v. 6, p. 3777-3801, 2014.

SUCCU, S. et al. Dose-dependent effect of melatonin on postwarming development of vitrified ovine embryos. **Theriogenology**, v. 81, p. 1058–1066, 2014.

SURAI, P. F. Selenium in nutrition and health. Nottingham, UK: Nottingham **University Press**; 2006.

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

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

TALEBI, A. et al. The effect of alpha lipoic acid on the developmental competence of mouse isolated preantral follicles. **J Assist Reprod Genet**, v, 29, p.175–183, 2012.

TANABE M. et al. Melatonin protects the integrity of granulosa cells by reducing oxidative stress in nuclei, mitochondria, and plasma membranes in mice. **Journal of Reprod Develop**, v. 61, p. 35–41, 2015.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Hoechst 33342**. EUA, 2010.

TING, A. Y.; XU, J.; STOUFFER, R. L. Differential effects of estrogen and progesterone on development of primate secondary follicles in a steroid-depleted milieu in vitro. **Hum Reprod**, Vol.30, No.8 pp. 1907–1917, 2015.

TILLY, J. L.; TILLY, K. I. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. **Endocrinology**, v. 136, p. 242–52, 1995.

VALDEZ, K. E.; CUNEO, S. P.; TURZILLO, A. M. Regulation of apoptosis in the atresia of dominant bovine follicles of the first follicular wave following ovulation. **Reproduction**, v. 130, p. 71-81, 2005.

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.

VELASCO, M. V. R. et al. Broad spectrum bioactive sunscreens. **Int J Pharma**, v. 363, p. 50-57, 2008.

WEI, SI-M.; YAN, ZHI-Z.; ZHOU, J. Protective effect of rutin on testicular ischemia-reperfusion injury. **J Pediatr Surg**, v. 46, p. 1419–1424, 2011.

WHITE, Y. A. R. et al. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. **Nat Med**, v. 18, p. 413–421, 2012.

WEEKLEY, C. M.; HARRIS, H. H. Which form is that? The importance of selenium speciation and metabolism in the prevention and treatment of disease. **Chem Soc Rev**. v. 42, p. 8870–8894, 2013.

WRIGHT, C. S. et al. Stagespecific and differential expression of gap junctions in the mouse ovary: connexin-specific roles in follicular regulation. **Reproduction**, v. 121 (1), p. 7–88, 2001.

WU, J.; EMERY, B. R.; CARRELL, D. T. In vitro growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. **Biol Reprod**, v. 381, p. 375–81, 2001.

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

XU, P. X. et al. Rutin improves spatial memory in Alzheimer's disease transgenic mice by reducing A β oligomer level and attenuating oxidative stress and neuroinflammation. **Behav Brain Res**, v. 8, p. 173-180, 2014.

YANG, M. Y.; FORTUNE, J. E. The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth in vitro develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. **Biol Reprod**, v. 78, p.1153–1161, 2008.

YEH, J. et al. Reproductive aging results in a reconfigured ovarian antioxidant defense profile in rats. **Fertil Steril**, v. 84, p.1109–13, 2005.

YUAN, Y.; WHEELER, M. B.; KRISHER, R. L. Disrupted redox homeostasis and aberrant redox gene expression in porcine oocytes contribute to decreased developmental competence. **Biol Reprod**, v. 87, p. 1-10, 2007.

ZIMMERMAN, M. T. et al. Sulfur and selenium antioxidants: Challenging radical scavenging mechanisms and developing structure–activity relationships based on metal binding. **J Inorg Biochem**, v. 145, p. 30–40, 2015.

ANEXO 1**RUTIN CAN REPLACE THE USE OF THREE OTHER ANTIOXIDANTS IN THE CULTURE MEDIUM, MAINTAINING THE VIABILITY OF SHEEP ISOLATED SECONDARY FOLLICLES****T.L.B.G. Lins, A.Y.P. Cavalcante, J.M.S. Santos, V.G. Menezes, V.R.P. Barros, R.S.****Barberino, M.É.S. Bezerra, T.J.S. Macedo, M.H.T. Matos***

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

*Correspondence should be addressed to:

Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF). Colegiado de Medicina Veterinária - Laboratório de Biologia Celular, Citologia e Histologia. Rodovia BR 407, Km 12, Lote 543 - Projeto de Irrigação Nilo Coelho - S/N, C1. CEP: 56300-990 - Petrolina - PE – Brasil. Tel.: +55.87.2101.4839.

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

Abstract

The present study evaluated the effect of addition of rutin alone or combined with other antioxidants (transferrin, selenium and ascorbic acid) present in the culture medium on the *in vitro* development of ovine isolated secondary follicles. After collection of the sheep ovaries, secondary follicles (200-230 μm) were isolated and cultured for 12 days in α -Minimal Essential Medium (α -MEM) supplemented with BSA, insulin, glutamine and hypoxanthine (α -MEM: antioxidant free-medium) or in this medium also added by transferrin, selenium and ascorbic acid (AO: base medium with antioxidants). Moreover, different concentrations of rutin (0.1; 1 or 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were added to the different base media (α -MEM or AO). The parameters analyzed were morphology, antrum formation, extrusion rate, follicular diameter, growth and fully-grown oocytes (oocytes $\geq 110 \mu\text{m}$) rates. In treatments that had the best results of morphology, follicular viability, apoptosis, glutathione (GSH), reactive oxygen species (ROS) levels and mitochondrial activity were also analyzed. After 12 days, the percentage of normal follicles was higher ($P < 0.05$) in α -MEM + 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rutin than the other treatments, except compared to AO medium ($P > 0.05$). There is no difference ($P > 0.05$) in the diameter and growth rate among treatments. Moreover, AO medium and α -MEM + 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rutin showed similar ($P > 0.05$) percentages of follicular viability, antrum formation, extruded follicles, fully-grown oocytes, levels of ROS and active mitochondria. However, α -MEM + 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rutin treatment showed higher ($P > 0.05$) GSH levels than AO medium. In conclusion, 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rutin can be used as the single antioxidant present in the base medium, replacing the addition of transferrin, selenium and ascorbic acid during *in vitro* culture of ovine secondary follicles, maintaining follicular viability and increasing GSH levels.

Keywords: Flavonoid, Oocyte, Ovine, GSH, Survival

1. Introduction

Production of embryos from oocytes derived from *in vitro* grown preantral follicles is still considered a challenge, since *in vitro* culture conditions may increase reactive oxygen species (ROS) exposure, decreasing antioxidant protection or causing mitochondrial damage, resulting in lower oocyte and embryo quality [1; 2; 3]. Therefore, the addition of antioxidants to the culture medium seems to be necessary to prevent or decrease the damage induced by *in vitro* oxidative stress [4; 5]. Although different antioxidants have been routinely added to the base medium, such as transferrin, selenium and ascorbic acid [6; 7], some studies have also tested the effects of other substances with antioxidant potential [8; 9; 10].

Recently the antioxidant effects of rutin have drawn increasing attention [11; 12; 13]. Rutin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone-3-rhamnoglucoside) is an important flavonoid, also known as vitamin P or quercetin-3-O-rutinoside, that is consumed in the daily diet, being found in fruits, vegetables or in medicinal plants [14; 15]. Little is known about possible effects of rutin on reproduction. *In vitro* studies have shown that rutin decreases lipid peroxidation, ROS levels and DNA fragmentation in thawed deer spermatozoa after incubation at 37°C [16] and preserves the viability and motility of human spermatozoa when used in the sperm selection by swim up procedure [11]. Moreover, rutin (5 µM) decreases oxidative stress in ovarian cells of Chinese hamster [17]. However, there is no information about the effect of rutin on the *in vitro* culture of ovarian follicles. Furthermore, as antioxidant substances may act as pro-oxidants when used in excess [18; 19], we hypothesized that rutin could replace the other antioxidants present in the culture medium.

Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of different concentrations of rutin as the only antioxidant added to the base culture medium or combined with other antioxidants (transferrin, selenium and ascorbic acid) on *in vitro* morphology, viability, development, apoptosis, oxidative stress markers (ROS and GSH intracellular levels) and metabolically active mitochondria of isolated ovine secondary follicles.

2. Material and Methods

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

2.1. Source of ovarian tissue

Ovaries (n = 180) were collected at a local abattoir from 90 adult (1–3 years old) mixed-breed sheep (*Ovis aries*). Immediately post-mortem, pairs of ovaries were washed once in 70% alcohol and then twice in Minimum Essential Medium buffered with HEPES (MEM-HEPES) and supplemented with antibiotics (100 µg/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin). Next, the ovaries were transported within 1 h to the laboratory in tubes containing MEM-HEPES with antibiotics at 4°C [20].

2.2. Isolation and selection of ovine secondary follicle

In the laboratory, the surrounding fatty tissues and ligaments were stripped from the ovaries; large antral follicles and corpora lutea were removed. Ovarian cortical slices (1–2 mm thick) were cut from the ovarian surface using a surgical blade under sterile conditions

and subsequently placed in holding medium consisting of MEM-HEPES with antibiotics. Ovine secondary follicles, approximately 200-230 μm in diameter without antral cavities, were visualized under a stereomicroscope (SMZ 645 Nikon, Tokyo, Japan) and mechanically isolated by microdissection using 26-gauge (26 G) needles. These follicles were then transferred to 100 μL droplets containing basic culture medium for the evaluation of quality. Only follicles that displayed the following characteristics were selected for culture: an intact basement membrane, two or more layers of granulosa cells and a visible and healthy oocyte that was round and centrally located within the follicle, without any dark cytoplasm. Isolated follicles were pooled and then randomly allocated to the treatment groups, with approximately 60 follicles per group.

2.3. *In vitro* culture of ovine secondary follicle (experimental protocol)

After selection, the follicles were randomly divided into eight 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 base control media consisted of α -MEM (pH 7.2–7.4) supplemented with 3.0 mg/mL BSA, 10 ng/mL insulin, 2 mM glutamine and 2 mM hypoxanthine (antioxidant free-medium, called α -MEM) or this medium also added by 5.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ transferrin, 5.0 ng/mL selenium and 50 ng/mL ascorbic acid (medium containing antioxidants, referred as AO). To verify the effects of rutin, both base media (α -MEM or AO) were supplemented with different concentrations of rutin (0.1, 1 or 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Fig. 1). All follicles were cultured at 39 °C under 5% CO_2 for up to 12 days. Every 2 days, in all treatments, 60 μL of the culture media was replaced with fresh media in each droplet.

2.4. Morphological evaluation of follicle development

The morphological aspects of all follicles were assessed every 6 days using a pre-calibrated ocular micrometer in a stereomicroscope (SMZ 645 Nikon) at x 100 magnification. Only those follicles showing an intact basement membrane, with bright and homogeneous granulosa cells and an absence of morphological signs of degeneration were classified as morphologically normal follicles. Follicular atresia was recognized when a darkening of the oocytes and surrounding cumulus cells or misshapen oocytes was noted. The rupture of the basement membrane was also observed and characterized as oocyte extrusion. The following characteristics were analyzed in the morphologically normal follicles: (i) antral cavity formation, defined as the emergence of a visible translucent cavity within the granulosa cell layers, (ii) the diameter of healthy follicles, measured from the basement membrane, which included two perpendicular measures of each follicle, and (iii) the daily growth rate, calculated as the diameter variation during the culture period (12 days).

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

2.5. Assessment of follicular viability after culture

Additional analyses were performed for a more accurate evaluation of follicular quality in the treatments that obtained the best results after 12 days of culture (AO medium or α -MEM + RT 0.1 treatment). For live/dead fluorescent labeling, follicles (approximately

20 follicles per treatment group) were placed in droplets of 100 μ L of phosphate buffered saline (PBS) with 4 μ M calcein-AM and 2 μ M ethidium homodimer-1 (Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe, Germany), followed by incubation at 39°C for 15 min. After this, the follicles were washed in PBS and were examined using a fluorescence microscope (Nikon E200, Tokyo, Japan) at a magnification of x 400. The emitted fluorescent signals of calcein-AM and ethidium homodimer-1 were collected at 450-490 nm. The follicles were considered live if the cytoplasm was labeled positively with calcein-AM (green) and dead if cellular chromatin was labeled with ethidium homodimer-1 (red).

2.6. Detection of apoptotic cells by TUNEL assay

To assess DNA fragmentation and apoptosis, at the end of culture, oocytes were subjected to the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) assay as previously described [21]. Briefly, healthy oocytes were fixed in 4% paraformaldehyde solution for 1 h at room temperature. Then, oocytes (approximately 20 oocytes per treatment group) were washed three times in solution of PBS/polyvinylpyrrolidone (PVP) and stored at 4°C in eppendorf with PBS/PVP until the beginning of TUNEL procedure. Therefore, oocytes were incubated in droplets of 100 μ 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 μ L containing DNase free RNase (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) at 37°C for 1 h and washed 3 times in drops of PBS/PVP. The TUNEL assay was prepared as indicated by the manufacturer (In Situ Cell Detection Kit, Fluorescein: Boehringer Mannheim/Roche Diagnostics Ltd., Indianapolis, USA). To this end, 7.5 μ L terminal deoxynucleotidyl transferase (DTT) enzyme and 67.5 μ L of marker solution of 2-deoxyuridine triphosphate 5-

FITC - FITC- dUTP were made to obtain 75 μ L of TUNEL mixture for reaction. The experimental groups and the positive control were incubated with 15 μ L of this solution for 1 h at 37°C in a moist chamber in the dark. The negative control was incubated at 15 μ L with the marker solution. Oocytes were washed 3 times in drops of PBS/PVP and incubated in drops of PBS containing 10 mM Hoechst 33342 for 15 minutes at room temperature in the dark. Then, oocytes were washed in drops of PBS/PVP and slides were prepared for evaluation using an epifluorescence microscope (Nikon E200, Tokyo, Japan) at a magnification of x 400. Oocytes were considered apoptotic when they have marked chromatin green fluorescence.

2.7. Assessment of oxidative stress markers (ROS and GSH intracellular levels) and metabolically active mitochondria

After culture, the oocytes were recovered and intracellular GSH and ROS levels and mitochondrial activity were measured as previously described [22; 23], with minor modifications. Briefly, 4-chloromethyl-6.8-difluoro-7-hydroxycoumarin (CellTracker® Blue; CMF2HC; Invitrogen Corporation), 2', 7'- dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA; Invitrogen Corporation) and MitoTracker Red (MitoTracker® Red, CMXRos, Molecular Probes, Melbourne, Victoria, Australia) were used to detect intracellular GSH, ROS and mitochondrial activity levels as blue, green and red fluorescence, respectively. Oocytes (approximately 20 oocytes per treatment group) were incubated (in the dark) for 30 minutes in PBS supplemented with 10 mM of CellTracker® Blue, 10 mM of H2DCFDA and 100 nM MitoTracker® Red at 39°C. After incubation, the oocytes were washed with PBS and the fluorescence was observed under an epifluorescence microscope with UV filters (370 nm for GSH, 460 nm for ROS and 579-599 nm for active mitochondria).

Fluorescent images were saved as image TIFF format and the fluorescence intensities of oocytes were analyzed using Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

2.8. Statistical analysis

Data from follicle survival, extruded follicles, antrum formation, viability and retrieval of grown oocytes after *in vitro* culture were expressed as percentages and compared by the Chi-squared test. Data from GSH, ROS and mitochondrial activity were submitted to ANOVA. Data from follicular diameter, increase in the diameter and growth rate 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 least significant difference Fisher test and expressed as percentage. The results were expressed as the means \pm standard error mean (SEM), and differences were considered significant when $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Follicular morphology and development after *in vitro* culture

Morphologically normal follicles showed centrally located oocytes and normal granulosa cells, which were enclosed by an intact basement membrane (Fig. 2A). As early as day 6 of the culture, a small antral cavity (Fig. 2B), atretic (Fig. 2C) and extruded (Fig. 2D) follicles could be observed. The percentage of morphologically normal follicles decreased significantly from day 0 to day 6 in all treatments (Fig. 3). In addition, at day 12 of culture,

the percentage of morphologically normal follicles was significantly higher in α -MEM + 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rutin (81.6%) than the other treatments, except compared to AO base medium (74.5%) ($P > 0.05$).

All treatments induced a significant increase in the percentages of antral cavity formation from day 0 to day 6, maintaining the rates ($P > 0.05$) until day 12 of culture (Fig. 4). At the end of culture, there were no significant differences among α -MEM, α -MEM + 0.1 or 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rutin, AO medium or AO added by 1 or 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rutin, regarding to the antrum formation. Moreover, no differences ($P > 0.05$) in extrusion rate, follicular diameter and daily growth rate were observed among treatments (data not shown). At day 12, the percentage of oocytes $\geq 110 \mu\text{m}$ was similar ($P > 0.05$) between α -MEM + 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rutin (50%) and AO medium (47.4%) and both were significantly higher than the other treatments, except for α -MEM + 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rutin (32.1%) and AO + 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rutin (32.7%) (Fig. 5).

3.2. Follicular viability and oocyte apoptosis detection after *in vitro* culture

Based on the results of morphology, additional analyses were performed in α -MEM + 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rutin treatment and AO medium. At the end of culture, 73-77% of the follicles were viable (Fig. 6) and no differences ($P > 0.05$) were observed between the two groups. The TUNEL assay revealed the absence or very few apoptotic oocytes after 12 days of culture (Fig. 7A). Negative control did not show staining for TUNEL analysis (Fig. 7B) and all oocytes were apoptotic in the positive control (Fig. 7C). All oocytes showed marking chromatin with Hoechst 33342 in blue fluorescence (Fig. 7D-F). No differences ($P > 0.05$) on TUNEL-positive oocytes were observed among treatments (no positive oocytes for AO medium and 13.63% positive oocytes for α -MEM + 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rutin).

3.3. Intracellular GSH and ROS levels and active mitochondria

After 12 days of culture, oocytes cultured in α -MEM (without antioxidants) supplemented with 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rutin showed greater levels of intracellular GSH than AO medium (without rutin) ($P < 0.05$). Levels of intracellular ROS and active mitochondria were similar ($P > 0.05$) between treatments (Fig. 8).

4. Discussion

This study is the first report to demonstrate the beneficial effects of rutin on the *in vitro* culture of ovarian follicles. Besides maintaining viability and promoting ovine secondary follicle development similarly to the base medium containing three different antioxidants (transferrin, selenium and ascorbic acid), rutin (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), added as the single antioxidant to the medium, improves intracellular GSH levels after culture.

Some reports suggested that 5.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ transferrin, 5.0 ng/mL selenium and 50 ng/mL ascorbic acid are the respective optimum concentrations for the *in vitro* culture of caprine and ovine secondary follicles [10; 24]. Transferrin, a metal-binding protein, and ascorbic acid, the vitamin C, prevent formation of hydroxyl radical by preventing them from participation in ROS reactions. Selenium is an essential part of a range of selenoproteins, including glutathione peroxidase (GSH-Px), which is responsible for decomposition of peroxides by converting them to non-radical, nontoxic products (Se-GSH-Px) [25; 26]. This mineral also suppresses apoptosis in granulosa cells of follicles cultured *in vitro* [27; 28]. However, in the current study, these three antioxidants added together to the base medium promoted the same effects as rutin alone (viability, apoptosis, antrum formation). Rutin has been reported to scavenge superoxide radicals and to chelate metal ions, thus preventing lipid peroxidation [29]. Some authors demonstrated that rutin may interact with the polar

head of phospholipids at water lipid interface, enhancing membrane rigidity and consequently protecting membranes from oxidative damage [30]. Therefore, rutin seems to be efficient for maintaining ovine ovarian follicle morphology (81.6%) and for inhibiting apoptosis during culture.

It is noteworthy that antioxidant free-medium (α -MEM) showed percentages of totally grown oocytes lower (27.8%) than antioxidant supplemented medium (AO) or α -MEM plus 0.1 $\mu\text{g/mL}$ rutin (approximately 50%). These results demonstrate the importance of the supplementation of the base medium with antioxidant substances to promote an adequate follicular development, and thus, higher rates of fully grown oocytes to further *in vitro* maturation (IVM). In addition, it is known that some antioxidant substances may act as prooxidants when used in excess [18]. For example, rutin can act as prooxidants because the presence of O_2 and transition metals like iron and copper catalyze the redox cycling of phenolics and may lead to the formation of ROS and phenoxyl radicals which damage DNA, lipids and other biological molecules [32; 33]. Therefore, in our study, we suggest that rutin alone may act as a prooxidant agent at 1 or 10 $\mu\text{g/mL}$ or even at the lower concentration (0.1 $\mu\text{g/mL}$) in combination with the other three antioxidants of the medium during *in vitro* culture.

Nevertheless, in an adequate concentration, rutin (0.1 $\mu\text{g/mL}$) increased GSH levels compared to AO base medium. GSH is the most abundant non-protein thiol and the major redox buffer of the cell [34]. Rutin increased the levels of GSH because of enhancement of GSH synthesizing enzyme activities such as glutathione reductase (GR) and by prevention GSH depletion [35]. In addition, rutin has been used as a catalytic mediator for detection of GSH, demonstrating the positive relation between rutin and this enzyme [36]. On the other hand, selenium regulates glutathione reductase (GSH) pool and its major Se-containing antioxidant enzyme, glutathione peroxidase (GPX), which converts oxidized glutathione

[37]. Therefore, it seems that selenium may increase GPX instead of GSH, and this could be one reason for lower GSH expression in the AO base medium.

Recent studies have shown that rutin markedly inhibited the mitochondrial dysfunction in spermatozoa cells subjected to oxidative stress [16]. Similarly, selenium prevents metal-mediated oxidative DNA damage [25; 26]. In the current study, active mitochondria levels did not differ between treatments, besides they had low rates or absence of apoptotic oocytes. However ROS levels also did not differ between treatments. It is important to mention that ROS are no longer viewed as just toxic by-products of mitochondrial respiration, but are now appreciated for their role in regulating various cellular signaling pathways [38]. Therefore, we suggest that ROS levels observed in the present study may be considered normal at cellular level and balanced with antioxidants defense system.

Finally, no effect on follicular growth was observed. After antrum formation, the follicle become dependent on FSH [39], suggesting that the use of FSH in the base culture medium and an increased culture period may be necessary to give a large support to antral follicle growth.

In conclusion, rutin, at a concentration of 0.1 $\mu\text{g/mL}$, can be used as the single antioxidant present in base medium, replacing the addition of transferrin, selenium and ascorbic acid during *in vitro* culture of ovine secondary follicles for 12 days, maintaining follicular viability and increasing GSH levels. Further studies are needed to mature and fertilize *in vitro* grown oocytes.

5. Acknowledgments

T. L. B. G. Lins receives a scholarship from the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE, Brazil). M. H. T. Matos is supported by a grant from CNPq (310712/2015-7).

6. References

- [1] Agarwal A, Said TM, Bedaiwy MA, Banerjee J, Alvarez JG. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertil Steril* 2006; 86: 503-512.
- [2] Chappel S. (2013). The role of mitochondria from mature oocyte to viable blastocyst. *Obstet Gynecol Int* 2013; 2013: 1-10.
- [3] Succu S, Pasciu V, Manca ME, Chelucci S, Torres-Rovira L, Leoni GG, Zinellu A, Carru C, Naitana S, Berlinguer F. Dose-dependent effect of melatonin on postwarming development of vitrified ovine embryos. *Theriogenology* 2014; 81: 1058–1066.
- [4] Yuan Y, Wheeler MB, Krisher RL. Disrupted redox homeostasis and aberrant redox gene expression in porcine oocytes contribute to decreased developmental competence. *Biol Reprod* 2012; 87: 1-10.
- [5] Rajabi-Toustani R, Motamedi-Mojdehi R, Mehr M, Motamedi-Mojdehi R. Effect of *Papaver rhoeas* L. extract on in vitro maturation of sheep oocytes. *Small Rumin Res* 2013; 114: 146–151.
- [6] Luz VB, Araújo VR, Duarte ABG, Silva GM, Chaves RN, Brito IR, Serafim MKB, Campello CC, Feltrin C, Bertolini M, Almeida AP, Santos RR, Figueiredo JR. Kit ligand and insulin-like growth factor I affect the in vitro development of ovine preantral follicles. *Small Ruminant Research* 2013; 115: 99– 102.
- [7] Santos LP, Barros VRP, Cavalcante AYP, Menezes VG, Macedo TJS, Santos JMS, Araújo VR, Queiroz MAA, Matos MHT. Protein localization of epidermal growth factor in

sheep ovaries and improvement of follicle survival and antrum formation in vitro. *Reprod Dom Anim* 2014; 49: 783–789.

[8] Gong SP, LIM JM. Effects of β -Mercaptoethanol on the Growth of Preantral Follicles and the Maturation of Intrafollicular Oocytes. *Asian-Aust. J Anim Sci* 2009; 22: 35 – 41.

[9] Talebi A, Zavareh S, Kashani MH, Lashgarbluki T, Karimi I. The effect of alpha lipoic acid on the developmental competence of mouse isolated preantral follicles. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29: 175–183.

[10] Sá NAR, Araújo VR, Correia HHV, Ferreira ACA, Guerreiro DD, Sampaio AM, Escobar E, Santos FW, Moura AA, Lôbo CH, Ceccatto VM, Campello CC, Rodrigues APR, Leal-cardoso JH, Figueiredo JR. Anethole improves the in vitro development of isolated caprine secondary follicles. *Theriogenology* 2016; doi: 10.1016/j.2015.12.014.

[11] Moretti E, Mazzi L, Terzuoli G, Bonechi C, Iacoponi F, Martini S, Rossi C, Collodel G. Effect of quercetin, rutin, naringenin and epicatechin on lipid peroxidation induced in human sperm. *Reproductive Toxicology* 2012; 34: 651– 657.

[12] Choi KS, Kundu JK, Chun KS, Na HK, Surh YJ. Rutin inhibits UVB radiation-induced expression of COX-2 and iNOS in hairless mouse skin: p38 MAP kinase and JNK as potential targets. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2014; 559: 38-45.

[13] Kaur S, Muthuraman A. Therapeutic evaluation of rutin in two-kidney one-clip model of renovascular hypertension in rat. *Life Sciences* 2016; 150: 89-94.

[14] Atanassova M, Bagdassarian V. Rutin content in plant products. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy* 2009; 44: (2) 201-203.

[15] Feng R, Wang Q, Tong W, Xiong J, Wei Q, Zhou W, Yin Z, Yin X, Wang L, Chen Y, Lai Y, Huang H, Luo Q, Wang L, Jia R, Song X, Zou Y, LI L. Extraction and antioxidant activity of flavonoids of *Morus nigra*. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8 (12): 22328-22336.

- [16] Mata-campuzano M, Alvarez-rodríguez M, Alvarez M, Anel L, De Paz P, Garde J. Effect of several antioxidants on thawed ram spermatozoa submitted to 37 °C up to four hours. [Reproduction In Domestic Animals](#) 2012; 47: 907-914.
- [17] Aherne SA, O' Brie NM. The flavonoids, myricetin, quercetin and rutin, protect against cholestan-3 β , 5 α , 6 β -triol - induced toxicity in Chinese hamster ovary cells in vitro. Nutrition Research 1999; 19 (5): 749-760.
- [18] Andrade ER, Melo-Sterza FA, Seneda MM, Alfieri, AA. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. *Rev Bras Reprod Anim* 2010; 34: 79–85.
- [19] Delmas D, Aires V, Dutartre P, Mazué F, Ghiringhelli F, Latruffe N. Transport, stability, and biological activity of resveratrol. *Ann NY Acad Sci.* 2011; 1215: 48-59.
- [20] Chaves RN, Martins FS, Saraiva MVA, Celestino JJH, Lopes CAP, Correia JC, Matos MHT, BÁO SN, NAME KPO, CAMPELLO CC, SILVA JRV, FIGUEIREDO J. R. Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured *in vitro*. *Reprod Fertility and Development* 2008; 20: 640-647.
- [21] Li HJ, Liu DJ, Cang M, Wang LM, Jin MZ, Ma YZ, Shorgan B. Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocytes. *Animal Reproduction Science* 2009; 114: 89–98.
- [22] Kwak SS, Cheong SA, Jeon Y, Lee E, Choi KC, Jeung EB, Hyun SH. The effects of resveratrol on porcine oocyte in vitro maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and in vitro fertilization. *Theriogenology* 2012; 78: 86–101.
- [23] Tanabe M. et al. Melatonin protects the integrity of granulosa cells by reducing oxidative stress in nuclei, mitochondria, and plasma membranes in mice. *Journal of Reproduction and Development* 2015; 61: 35–41.

- [24] Barberino RS. Et Al. *Amburana cearensis* leaf extract maintains survival and promotes *in vitro* development of ovine secondary follicles. *Zygote* 2015. 1-9.
- [25] Zimmerman MT, Bayse CA, Ramoutar RR, Brumaghim JL. Sulfur and selenium antioxidants: Challenging radical scavenging mechanisms and developing structure–activity relationships based on metal binding. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2015; 145: 30–40.
- [26] Surrai PF, Fisinin VI, Karadas F. Antioxidant systems in chick embryo development. Part 1. Vitamin E, carotenoids and selenium. *Animal Nutrition* 2016; 2: 1-11.
- [27] Tilly JL, Tilly KI. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. *Endocrinology* 1995; 136: 242–52.
- [28] Yeh J, Bowman MJ, Browne RW, Chen N. Reproductive aging results in a reconfigured ovarian antioxidant defense profile in rats. *Fertility and Sterility* 2005; 84: 1109–1113.
- [29] Omolou PA, Rocha JBT, Kade IJ. Attachment of rhamnosyl glucoside on quercetin confers potent iron-chelating ability on its antioxidant properties. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2011; 63: 249–255.
- [30] Erlejman AG, Verstraeten SV, Fraga CG, Oteiza PI. “The interaction of flavonoids with membranes: potential determinant of flavonoid antioxidant effects,” *Free Radical Research* 2004; 38: 1311–1320.
- [31] Golveia BB, Macedo TJS, Santos JMS, Barberino RS, Menezes VG, Müller MC, Almeida JRGS, Figueiredo JR, Matos MHT. Supplemented base medium containing *Amburana cearensis* associated with FSH improves *in vitro* development of isolated goat preantral follicles. *Theriogenology* 2016; DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.2016.04.068>.

- [32] Galati G, O'Brien PJ. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 287-303.
- [33] Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 2011; 82: 513–523.
- [34] Hatem E, Berthonaud V, Dardalhon M, Lagniel G, Baudouin-cornu P, Huang M, Labarre J, chédin S. Glutathione is essential to preserve nuclear function and cell survival under oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 2014; 67: 103–114.
- [35] Nafees S, Rashid S, Ali N, Hasan SK, Sultana S. Rutin ameliorates cyclophosphamide induced oxidative stress and inflammation in Wistar rats: Role of NFjB/MAPK pathway. *Chemico-Biological Interactions* 2015; 231: 98–107.
- [36] Huang Y, Yan H, Tong Y. Electrocatalytic determination of Reduced Glutathione using rutin as a mediator at acetylene black spiked carbon paste electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2015; 743: 25-30.
- [37] Mahmoud K, Edens F. Influence of selenium sources on age-related and mild heat stressrelated changes of blood and liver glutathione redox cycle in broiler chickens (*Gallus domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 2003; 136: 921–934.
- [38] Reczek CR, Chandel NS. ROS-dependent signal transduction. [Current Opinion in Cell Biology](#) 2015; 33: 8-13.
- [39] Erickson, GF, Shimasaki S. The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. *Fertility and Sterility* 2001; 76: 943-949.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1 - General experimental protocol for in vitro culture of sheep secondary follicles in different media without or with rutin.

Figure 2 - Morphologically normal secondary follicle at day 12 (A); antral follicle after 6 days of culture in α -MEM + RT 0.1 (B); atretic (C) and extruded (D) follicles after 6 days of culture in AO + RT 1. GC: granulosa cells; O: oocyte. Arrow: antral cavity. Scale bar: 100 μ m. α -MEM: antioxidant free-medium e AO: α -MEM containing antioxidants.

Figure 3 - Percentages of morphologically normal follicles cultured in different media added or not by different concentrations of rutin.

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

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

Figure 4 - Percentages of antrum formation in follicles cultured in different media added or not by different concentrations of rutin.

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

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

Figure 5 - Percentages of fully grown oocytes after culture of secondary follicles in different media added or not by different concentrations of rutin.

(^{a, b, c}) Different letters denote significant differences among treatments in the same period ($P < 0.05$) ($P < 0.05$).

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

Figure 6 - Viable follicle after culture in α -MEM + RT 0.1 marked in green by calcein-AM (A) and dead follicle after culture in AO medium marked in red by ethidium homodimer-1 (B). α -MEM: antioxidant free-medium; AO: α -MEM containing antioxidants.

Figure 7 - Representative DNA fragmentation of sheep oocytes after 12 days of culture. Normal oocyte in AO medium (A and D), α -MEM + RT 0.1 (B and E) and apoptotic oocyte in positive control (C and F). Oocytes stained with TUNEL (A, B, C) and Hoechst 33342 (D, E, F). Note the DNA fragmentation, as evidenced by green chromatin in figure C (positive control). O: oocyte; Arrow: nuclear chromatin. Scale bars: 50 μ m. α -MEM: antioxidant free-medium; AO: α -MEM containing antioxidants.

Figure 8 - Epifluorescent photomicrographic images of ovine oocytes. (a) Oocytes were stained with CellTracker Blue (A, D), 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (B, E) and MitoTracker Red (C, F) to detect intracellular levels of GSH, ROS and active mitochondria, respectively. Oocytes cultured in α -MEM + RT 0.1 (A-C) or AO medium (D-F); Scale bars: 50 μ m (100x). (b) Intracellular levels of GSH, ROS and active mitochondria in sheep oocytes after 12 days of in vitro culture in AO medium or in α -MEM + RT 0.1. α -MEM: antioxidant free-medium; AO: α -MEM containing antioxidants. (^{A, B}) Bars with different letters are significantly different ($P < 0.05$).