



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Vanúzia Gonçalves Menezes

**EFEITO DO ÁCIDO PROTOCATECUICO SOBRE O**  
**DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS**  
**SECUNDÁRIOS OVINOS ISOLADOS**

**PETROLINA**

**2017**

**VANÚZIA GONÇALVES MENEZES**

**EFEITO DO ÁCIDO PROTOCATECUICO SOBRE O  
DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS  
SECUNDÁRIOS OVINOS ISOLADOS**

Trabalho apresentado à Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Campus de Ciências Agrárias, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciência Animal.

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

**PETROLINA**

**2017**

M541e Menezes, Vanúzia Gonçalves  
Efeito do ácido protocatecuico sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos secundários ovinos isolados / Vanúzia Gonçalves Menezes. -- Petrolina, 2017.  
XIV, 81 f.; il. ; 29 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, Petrolina, 2017.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Helena Tavares de Matos.

Referências.

1. Ovinos. 2. Reprodução animal. 3. Folículos pré-antrais – Cultivo *in vitro*. I. Título. II. Universidade Federal do Vale do São Francisco

CDD 636.0824

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

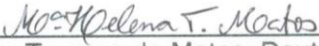
Vanúzia Gonçalves Menezes

**EFEITO DO ÁCIDO PROTOCATECUICO SOBRE O**  
**DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS**  
**SECUNDÁRIOS OVINOS ISOLADOS**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, pela Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Aprovada em: 23 de junho de 2017.

**Banca Examinadora**

  
\_\_\_\_\_  
(Maria Helena Tavares de Matos, Doutora, UNIVASF)

  
\_\_\_\_\_  
(Alexandre Rodrigues Silva, Doutor, UFERSA)

  
\_\_\_\_\_  
(José Roberto Viana Silva, Doutor, UFC)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, a coragem, a saúde, a sabedoria e a determinação diária.

Ao meu pai Valmir Soares de Menezes, pelos conselhos, exemplos, otimismo, garra e força.

Aos meus irmãos André Luíz Menezes, Edvaldo Menezes, Edinaldo Menezes e Valmira Alves pelo carinho, pela cumplicidade e torcida.

Aos meus sobrinhos Paloma Alves, Pâmela Alves, Marcos Wilson Alves, Luíz André Menezes, Maria Clara Menezes e Pedro Henrique Menezes pelo amor incondicional, pelos momentos de alegrias e cumplicidade.

Aos moradores da casa de estudante, especialmente a Milena Santos Coutinho, pelos momentos de conhecimento, sabedoria, alegrias e tristezas.

Aos colegas de disciplinas do Mestrado de Ciência Animal e de Ciências Veterinárias no Semiárido, pelos conhecimentos e momentos compartilhados.

Ao grupo de pesquisa Biotecnologia Aplicada ao Desenvolvimento de Folículos Ovarianos (BIOFOV): Agnes Yasmin, Alane Pains, Bruna Bortoloni, Maria Éllida Bezerra, Jamile Santos, Lara Rios, Melissa Müller, Ricássio Barberino, Taís Jobard, Vanessa Barros, Thae Lanne Lins e Victória Correia pelo companheirismo, ajuda e momentos compartilhados.

À minha orientadora Maria Helena Tavares de Matos, pela atenção, dedicação, paciência e imensa contribuição para minha formação acadêmica.

À Universidade Federal do Vale do São Francisco, pela disponibilidade de excelentes profissionais (professores, coordenadores e funcionários), especialmente a funcionária Rosângela (Rosinha) pela sua alegria, dedicação, consideração e carinho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo fornecimento da bolsa de mestrado.

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

## RESUMO

O ácido protocatecuico (PCA) é um composto fenólico que tem sido bastante estudado devido ao seu potencial antioxidante *in vivo* e *in vitro*. Entretanto, ainda não é conhecido o seu efeito antioxidante no cultivo *in vitro* de folículos secundários ovinos isolados. Sendo assim, o presente estudo avaliou o efeito do ácido protocatecuico (PCA), como único antioxidante no meio de cultivo, sobre a morfologia, o desenvolvimento, os níveis de GSH e mitocôndrias ativas, retomada da meiose e fragmentação de DNA de folículos secundários ovinos isolados cultivados *in vitro*. Folículos secundários (200-230  $\mu\text{m}$ ) foram isolados e cultivados durante 12 dias em meio controle constituído pelo Meio Essencial Mínimo ( $\alpha$ -MEM) suplementado com BSA, insulina, glutamina e hipoxantina ( $\alpha$ -MEM; meio sem antioxidantes) ou adicionado de transferrina, selênio e ácido ascórbico ( $\alpha$ -MEM+; com antioxidantes) ou de diferentes concentrações de PCA (56,25; 112,5; 225; 450; 900  $\mu\text{g/mL}$ ). A cada 6 dias, os folículos foram avaliados quanto aos aspectos morfológicos (folículos normais, formação de antro e diâmetro folicular). Ao final do cultivo, os oócitos foram recuperados para a determinação da percentagem de oócitos completamente crescidos (oócitos  $\geq 110 \mu\text{m}$ ) e os níveis intracelulares de glutathiona (GSH) e mitocôndrias ativas. Além disso, após o cultivo, os oócitos foram maturados e a configuração da cromatina e a fragmentação do DNA foram avaliados. Os dados de sobrevivência folicular, formação de antro, oócitos  $\geq 110 \mu\text{m}$ , retomada da meiose e fragmentação do DNA foram comparados pelo teste do Qui-quadrado; o diâmetro folicular, a taxa de crescimento, os níveis de GSH e a atividade mitocondrial foram submetidos ao teste de Agostinho-Pearson (análogo do teste Shapiro-Wilk) e Shapiro-Wilk, respectivamente, e comparados pelo teste Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ). Após 12 de cultivo, o meio contendo 56,25  $\mu\text{g/mL}$  de PCA apresentou sobrevivência folicular superior ao meio controle e demais tratamentos ( $P < 0,05$ ), exceto ao 900  $\mu\text{g/mL}$  de PCA ( $P > 0,05$ ). A formação de antro foi significativamente superior nos tratamentos contendo 56,25; 112,5 ou 900  $\mu\text{g/mL}$  de PCA, comparado ao  $\alpha$ -MEM, e similar ( $P > 0,05$ ) aos demais tratamentos. Em relação à extrusão, diâmetro folicular e taxa de crescimento diário, não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos. A taxa de oócitos completamente crescidos foi semelhante ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos contendo PCA e o  $\alpha$ -MEM+, e superior ( $P < 0,05$ ) ao  $\alpha$ -MEM, exceto o meio contendo 450  $\mu\text{g/mL}$  de PCA ( $P > 0,05$ ). Os níveis de GSH e a atividade mitocondrial oocitária foram superiores ( $P < 0,05$ ) em  $\alpha$ -MEM+ quando comprado ao  $\alpha$ -MEM, e similares ( $P > 0,05$ ) aos demais tratamentos. As taxas de retomada da meiose e fragmentação do DNA foram similar ( $P > 0,05$ ) entre  $\alpha$ -MEM+ e 56,25  $\mu\text{g/mL}$  de PCA. Conclui-se que o PCA (56,25  $\mu\text{g/mL}$ ), como único antioxidante adicionado ao meio para cultivo de folículos secundários ovinos isolados, substituindo a associação de transferrina, selênio e ácido ascórbico, mantém a sobrevivência folicular, os níveis de GSH e mitocôndrias ativas, a capacidade de retomada da meiose e a integridade do DNA de oócitos cultivados.

**Palavras-chave:** Composto fenólico. Oócito. Viabilidade. GSH. Mitocôndrias.

## ABSTRACT

Protocatechuic acid (PCA) is a phenolic compound that has been extensively studied due to its antioxidant potential *in vivo* and *in vitro*. However, its antioxidant effect in the *in vitro* culture of ovine isolated secondary follicles is not yet known. Thus, the present study evaluated the effect of protocatechuic acid (PCA), as the sole antioxidant in the culture medium, on the morphology, development, levels of GSH and active mitochondria, resumption meiosis and DNA fragmentation of ovine isolated secondary follicles cultured *in vitro*. 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  $\geq 110 \mu\text{m}$ ) was evaluated. The secondary follicles (200-230  $\mu\text{m}$ ) were isolated and cultured for 12 days in  $\alpha$ -Minimal Essential Medium ( $\alpha$ -MEM) supplemented with BSA, insulin, glutamine and hypoxanthine ( $\alpha$ -MEM: antioxidant free-medium) or added by transferrin, selenium and ascorbic acid ( $\alpha$ -MEM+; with antioxidant) or different concentrations of PCA (56.25; 112.5; 225; 450; 900  $\mu\text{g/mL}$ ). The parameters analyzed were morphology, antrum formation, extrusion rate, follicular diameter, growth, fully grown oocytes (oocytes  $\geq 110 \mu\text{m}$ ) rates, GSH intracellular levels and metabolically active mitochondria. Moreover, after culture, oocytes were matured and the chromatin configuration and DNA fragmentation were evaluated. The rates of normal follicles, antrum formation, oocytes  $\geq 110 \mu\text{m}$ , DNA fragmentation and meiotic resumption were compared by Qui-square test. Follicular diameter, growth rate and levels of GSH and mitochondrial activity were submitted to the Agostinho-Pearson test (analog of the Shapiro-Wilk test) and Shapiro-Wilk, respectively, and compared by the Kruskal-Wallis test ( $P < 0.05$ ). After 12 days, the treatment containing 56.25  $\mu\text{g/mL}$  PCA showed higher percentage of normal follicles than control medium and to the other treatments ( $P < 0.05$ ), except for 900  $\mu\text{g/mL}$  PCA ( $P > 0.05$ ). The antrum formation was significantly higher in treatments containing 56.25; 112.5 or 900  $\mu\text{g/mL}$  PCA, compared to the  $\alpha$ -MEM and similar ( $P > 0.05$ ) to the other treatments. The rates of fully grown oocytes ( $\geq 110 \mu\text{m}$ ) were similar ( $P > 0.05$ ) among all treatments containing PCA and  $\alpha$ -MEM+, and those were superior ( $P < 0.05$ ) to  $\alpha$ -MEM, except for 450  $\mu\text{g/mL}$  PCA ( $P > 0.05$ ). The oocyte levels of GSH and mitochondrial activity were higher ( $P < 0.05$ ) in  $\alpha$ -MEM+ compared to the  $\alpha$ -MEM and similar ( $P > 0.05$ ) to all PCA treatments. The rates of meiotic resumption and DNA fragmentation were similar ( $P > 0.05$ ) between  $\alpha$ -MEM+ and 56.25  $\mu\text{g/mL}$  PCA. In conclusion, PCA at 56.25  $\mu\text{g/mL}$  as the sole antioxidant added to the medium for ovine isolated secondary follicle culture, replacing the association of transferrin, selenium and ascorbic acid, maintains follicular survival, GSH and active mitochondria levels, meiotic developmental competence and DNA integrity of cultured oocytes.

**Keywords:** Phenolic compound, Oocyte, Viability, GSH, Mitochondria

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1** – Desenho esquemático da oogênese e foliculogênese. Fonte: Fonte: Adaptado de Figueiredo et al. (2008). 19
- Figura 2** - Características morfológicas de necrose e apoptose. Fonte: Adaptado de Anazetti; Melo, (2007). 23
- Figura 3** – Representação dos eventos apoptóticos observados nas vias extrínseca e intrínseca. Fonte: Faustino et al., (2011). 24
- Figura 4** - Cadeia respiratória mitocondrial. Fonte: Adaptado de Yu; Bennett, 2014. 25
- Figura 5** - Visão geral de múltiplas implicações da mitocôndria no envelhecimento ovariano e suas consequências deletérias sobre a função reprodutiva. Fonte: Adaptado de May-Panpaloup et al. (2016). 28
- Figura 6** - Desenho representativo dos tipos de cultivo *in vitro* de folículo ovariano. Fonte: Souza, (2013). 30
- Figura 7** - Representação esquemática dos sistemas de cultivos bi e tridimensionais. Fonte: Araújo et al., (2014). 30
- Figura 8** - Estrutura química do ácido protocatecuico (PCA). Fonte: Kakkar; Bais (2014). 34
- Figura 9** - Mecanismos de ação do ácido protocatecuico (PCA). Fonte: Arquivo pessoal. 35



## CAPÍTULO 1

**Figure 1.** General experimental protocol for *in vitro* culture of sheep secondary follicles in medium without ( $\alpha$ -MEM) or with antioxidant ( $\alpha$ -MEM+) or containing protocatechuic acid (PCA; concentration in  $\mu\text{g/mL}$ ). Antioxidants: transferrin, selenium and ascorbic acid.

57

**Figure 2.** Morphologically normal secondary follicle at day 0 (A); antral follicle after 6 days of culture in 56.25  $\mu\text{g/mL}$  PCA (B); atretic (C) and extruded (D) follicles after 6 days of culture in  $\alpha$ -MEM+. GC: granulosa cells; O: oocyte. Arrow: antral cavity. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ .  $\alpha$ -MEM+: medium with antioxidants (transferrin, selenium and ascorbic acid); PCA: protocatechuic acid.

57

**Figure 3.** Percentages of morphologically normal follicles cultured in  $\alpha$ -MEM without ( $\alpha$ -MEM), or with antioxidants ( $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>) or with different concentrations of protocatechuic acid (56.25; 112.5; 225; 450 or 900  $\mu\text{g/mL}$ ). (<sup>A, B, C</sup>) Different letters denote significant differences among treatments in the same period ( $P < 0.05$ ). (<sup>a, b, c</sup>) Different letters denote significant differences among culture periods in the same treatment ( $P < 0.05$ ).

58

**Figure 4.** Percentages of antrum formation in follicles cultured in  $\alpha$ -MEM without ( $\alpha$ -MEM), or with antioxidants ( $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>) or with different concentrations of protocatechuic acid (56.25; 112.5; 225; 450 or 900  $\mu\text{g/mL}$ ). (<sup>A, B, C</sup>) Different letters denote significant differences among treatments in the same period ( $P < 0.05$ ). PCA: protocatechuic acid.

59

**Figure 5.** Percentages of fully grown oocytes after culture of secondary follicles in  $\alpha$ -MEM without ( $\alpha$ -MEM), or with antioxidants ( $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>) or with different concentrations of protocatechuic acid (56.25; 112.5; 225; 450 or 900  $\mu\text{g/mL}$ ). (<sup>A, B, C</sup>) Different letters denote significant differences among treatments in the same period ( $P < 0.05$ ). (<sup>a, b, c</sup>) Different letters denote significant differences among culture periods in the same treatment ( $P <$

0.05). PCA: protocatechuic acid.

60

**Figure 6.** Epifluorescent photomicrographic images of ovine oocytes. Oocyte under bright field (A-G) were stained with CellTracker Blue (H-N) and MitoTracker Red (O-U) to detect intracellular levels of GSH and active mitochondria, respectively. Scale bars: 50  $\mu\text{m}$  (100x). Intracellular GSH (V) and active mitochondria (X) relative levels (pixel/oocyte) in sheep oocytes after 12 days of *in vitro* culture in medium without ( $\alpha$ -MEM) or with antioxidant ( $\alpha$ -MEM+) or containing protocatechuic acid (PCA; concentration in  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). (<sup>A</sup>, <sup>B</sup>) Bars with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

61

**Figure 7.** Epifluorescent photomicrographic images of ovine oocytes stained with Hoechst 33342 after IVM. Oocytes in GV (A) and GVBD (B) cultured in medium with antioxidant ( $\alpha$ -MEM+); oocytes in MI (C) and MII (D) cultured in medium containing 56.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  protocatechuic acid. O: oocyte; Arrow: nuclear chromatin. Scale bars: 50  $\mu\text{m}$ .

62

**Figure 8.** DNA fragmentation of sheep oocytes after IVM. Oocyte with DNA fragmentation after culture in medium with antioxidant ( $\alpha$ -MEM+) (A and C) and normal oocyte cultured in medium containing 56.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  protocatechuic acid (B and D). O: oocyte; Arrow: nuclear chromatin. Scale bars: 50  $\mu\text{m}$ . Oocytes stained with TUNEL (A and B) and Hoechst 33342 (C and D). Percentages of TUNEL positive oocytes (E).

63

**Table 1.** Meiotic stages (%) of sheep oocytes from *in vitro* grown secondary follicles after 12 days of culture in  $\alpha$ -MEM+ or 56.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PCA.

64

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

MPP+	1-methyl-4-phenylpyridinium ion (ion 1-metil-4-fenilpiridínio)
%	Porcentagem
≥	Maior ou igual
µm	Micrômetro(s)
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
ADP	Adenosina difosfato
AKT	Proteína quinase
ANOVA	Análise de variância
Apaf-1	Apoptotic protease-activating factor 1 (Fator de ativação de protease apoptótica 1)
ATP	Adenosina trifosfato
BMP	Proteína Morfogenética Óssea
BSA	Albumina sérica bovina
CAT	Capacidade antioxidante total
CCO	Complexo cumulus-oócito
CGP	Células germinativas primordiais
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CoQ	Coenzima Q
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
EGF	Epidermal Growth Factor (Fator de Crescimento Epidermal)
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FADH <sub>2</sub>	Dinucleotídeo de flavina e adenina reduzido
Fe <sup>2+</sup>	Ferro
FGF	Fibroblast Growth Factor (Fator de crescimento fibroblástico)
FGFβ	Transformation Growth Factor β (Fator de crescimento de transformação β)
FOXO3	Forkhead box O3 Factor Transcription (Fator de transcrição Forkhead BOX O3)
FSH	Follicle Stimulating Hormone (Hormônio Folículo)

	Estimulante)
GDF-9	Growth differentiation factor-9 (Fator de crescimento e diferenciação-9)
GDNF	Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor (Fator Neurotrófico Derivado das Células Gliais)
GH	Growing Hormone (Hormônio do crescimento)
GPX	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
H	Horas
H <sub>2</sub> DCFDA	2',7'-diacetate dichlorodihydrofluorescein (2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
IGF-1	Insulin-like growth factor 1 (Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1)
IGF-1R	Insulin-like growth factor 1 receptor (receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1)
KL	Kit Ligand
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LH	Luteinizing hormone (Hormônio Luteinizante)
LIF	Leukemia Inhibitory Factor (Fator inibidor de leucemia)
M	Metro(s)
µg	Micrograma (s)
MEM	Meio Essencial Mínimo
Mg	Miligrama(s)
mL	Mililitro(s)
MOIFOPA	Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzida
Ng	Nanograma
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
°C	Graus Celsius
.OH	Radical hidroxila

OSE	Epitélio da Superfície Ovariana
P < 0,05	Probabilidade de erro menor do que 5%
PCA	Protocatechuic acid (Ácido protocatecuico)
PBS	Phosphate buffered saline (Tampão fosfato salino)
SOD	Superóxido dismutase
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (Fator de crescimento endotelial vascular)
$\alpha$ -MEM	Meio Essencial Mínimo-alfa modificado
$\mu$ g	Micrograma(s)
$\mu$ L	Microlitro(s)
$\mu$ M	Micromolar

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>2.</b>	<b>DESENVOLVIMENTO</b>	<b>17</b>
	<b>2.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>17</b>
	<b>2.1.1. Morfofisiologia ovariana: Oogênese e foliculogênese</b>	<b>17</b>
	2.1.1.1. Oogênese	17
	2.1.1.2. Foliculogênese	18
	2.1.1.2.1. Fase pré-antral	18
	2.1.1.2.2. Fase pré-antral	21
	<b>2.1.2. Relação entre atresia folicular, mitocôndria e estresse oxidativo</b>	<b>22</b>
	<b>2.1.3. MOIFOPA</b>	<b>28</b>
	2.1.3.1. Aplicações da MOIFOPA em ovários ovinos	28
	2.1.3.2. Tipos e sistemas de cultivo de folículos pré-antrais	29
	2.1.3.3. Meio de cultivo <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais e antioxidantes	31
	<b>2.1.4. Ácido protocatecuico</b>	<b>33</b>
<b>3.</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>37</b>
<b>4.</b>	<b>HIPÓTESE</b>	<b>38</b>
<b>5.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>39</b>
	5.1. Objetivo geral	39
	5.2. Objetivos específicos	39
<b>6.</b>	<b>CAPITULO 1</b>	<b>40</b>
<b>7.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>66</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>67</b>
	<b>ANEXO 1 – Certificado de Aprovação no Comitê de Ética</b>	<b>81</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Na tentativa de aumentar o potencial reprodutivo de animais ovinos de alto valor zootécnico, algumas biotécnicas reprodutivas vêm sendo aprimoradas, tais como a fertilização *in vitro* (FIV), a produção *in vitro* de embriões (PIV) e a Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais (MOIFOPA), também conhecida como ovário artificial.

A MOIFOPA tem como objetivos o resgate, a conservação, o cultivo e a posterior maturação *in vitro* de oócitos inclusos em folículos pré-antrais, evitando que os mesmos sofram o processo fisiológico denominado de atresia ou morte folicular (FIGUEIREDO et al., 2008). Entretanto, um dos fatores que pode interferir na viabilidade folicular durante o cultivo *in vitro* é o estresse oxidativo, causado pelo desbalanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a atuação de agentes antioxidantes. Isto pode ser contornado pela adição de substâncias antioxidantes ao meio de cultivo (ABEDELAKHI et al., 2010; TALEBI et al., 2012).

Diversos estudos têm demonstrado que a adição, ao meio de cultivo, de uma concentração ideal de antioxidantes comumente utilizados, tais como o selênio, ácido ascórbico e transferrina (LUZ et al., 2012; GOUVEIA et al., 2016) ou ainda de ácido alfa-lipóico (ALA),  $\beta$ -mercaptoetanol, e anetole (GONG; LIM, 2009; TALEBI et al., 2012; SÁ et al., 2015) auxilia na manutenção da sobrevivência e no desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais isolados. Além disso, o extrato da planta medicinal *Amburana cearensis* manteve a sobrevivência folicular após preservação de tecido ovariano caprino a 4°C (GOUVEIA et al., 2015) e após o cultivo de folículos secundários isolados de ovinos e caprinos (BARBERINO et al., 2016; GOUVEIA et al., 2016). O principal componente encontrado nesse extrato é o ácido protocatecuico (PCA, ácido 3,4-diidroxibenzoico).

O PCA é um polifenol natural, encontrado em diferentes tipos de vegetais. Esse composto tem sido estudado devido ao seu potencial neuroprotetor, cardioprotetor, antibacteriano, anticancerígeno, antidiabético, antiviral, analgésico, anti-inflamatório e antioxidante (KAKKAR; BAIS, 2014). Estudos demonstraram que a ação antioxidante do PCA em ensaios antioxidantes e no cultivo *in vitro* de células neuronais de ratos se dá através da quelatação de íons metálicos, da eliminação de EROs e do aumento de fatores antioxidantes, como a glutathione e a enzima catalase (GUAN et al., 2006a; GUAN et al., 2011; LI et al., 2011). Além disso, o PCA

diminuiu os achados histopatológicos em testículos de ratos após estresse oxidativo causado por 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) (BEYTUR et al., 2012). Entretanto, não há relatos sobre a ação do PCA no cultivo *in vitro* de folículos secundários ovinos isolados.



## **2. DESENVOLVIMENTO**

### **2.1. REVISÃO DE LITERATURA**

#### **2.1.1. Morfofisiologia ovariana: Oogênese e foliculogênese**

O ovário ovino, assim como o das demais espécies mamíferas, é um órgão altamente organizado, sendo composto por células germinativas (oócito) e células somáticas (células da granulosa, células da teca e células estromais), que interagem entre si para a formação e desenvolvimento oocitário e folicular, ovulação e formação do corpo lúteo (RICHARDS; PANGAS, 2016), essenciais à fecundação, desenvolvimento embrionário e nascimento de crias (WILHELM; PALMER; KOOPMAN, 2007; CAMPBELL, 2009). Diante da importância ovariana na reprodução, estudos buscam explicar os processos e mecanismos envolvidos na sua formação, desenvolvimento e fisiologia.

##### **2.1.1.1. Oogênese**

Após a formação do zigoto, todas as células embrionárias até o estágio de oito células parecem ser totipotentes. Entretanto, quando ocorre a formação de mórula de 16 células, as células começam a sofrer um processo de diferenciação. Esta diferenciação torna-se maior com a formação do blastocisto, no qual três linhagens são definidas: trofotoderma (futura placenta), epiblasto (futuro embrião), e endoderme primitiva (futuro saco vitelino). Após implantação e contínua diferenciação, células do epiblasto, eventualmente, formarão os precursores das células germinativas primordiais (CGPs) que são as primeiras células do futuro ovário a ser formado (EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009).

O processo em que ocorre a formação e diferenciação das células germinativas primordiais (CGPs) até a formação do oócito haploide fecundado é denominado de oogênese (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006). Em ovelhas, objeto de estudo do presente trabalho, as CGPs migram do saco vitelínico, em torno de 17 a 21 dias (LEDDA et al., 2010), e se instalam na gônada análoga (SOTO-SUAZO; ZORN, 2005). Em seguida, sofrem sucessivas mitoses, diferenciam-se em oogônias (AERTS; BARLS, 2010). As oogônias proliferam-se por meio de intensas

divisões mitóticas (FIGUEIREDO et al., 2008) e apresentam um maior número de organelas intracelulares (ABIR et al., 2006). Ao final do ciclo, as oogônias ( $2n$ ) aumentam de tamanho, e posteriormente, iniciam a divisão meiótica, formando um oócito primário ou imaturo, que possui núcleo estacionado na prófase I (estádio de diplóteno) (MOORE; PERSAUD, 2008; MONIRUZZAMAN; MIYANO, 2010; BAILLET; MANDON-PEPIN, 2012; SÁNCHEZ; SMITZ, 2012).

Na puberdade, com o pico pré-ovulatório do hormônio Luteinizante (LH), o oócito primário retoma a meiose (passando pelos estágios de metáfase I, anáfase I, telófase I e prófase II), no processo de ovulação e sofre a segunda parada da meiose (metáfase II) (BAILLET; MANDON-PEPIN, 2012; SÁNCHEZ; SMITZ, 2012), e após ser fecundado, retoma a meiose, formando o oócito haploide fecundado (FIGUEIREDO et al., 2008) (Figura 1).

Apesar de saber que a oogênese ovina inicia-se ainda na vida embrionária, estudo recente demonstrou que células tronco pluripotentes, obtidas a partir do epitélio da superfície ovariana (OSE) de ovelhas adultas, têm a capacidade de se diferenciar em estruturas semelhantes a óocitos *in vitro*. Entretanto, ainda há a necessidade de mais estudos para verificar se estas estruturas teriam a capacidade de serem fecundadas (PARTE et al., 2011).

### **2.1.1.2. Foliculogênese**

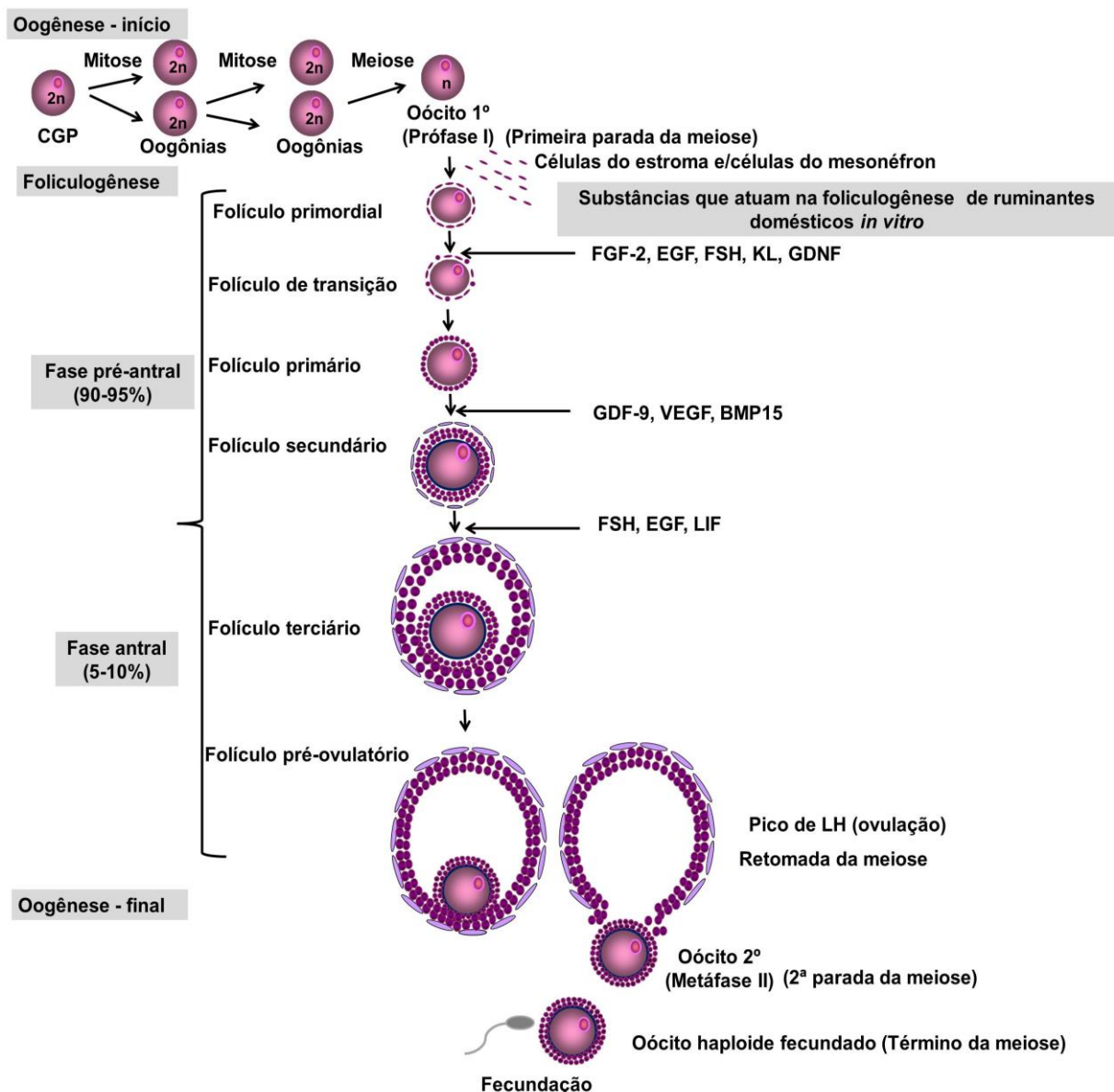
O processo de formação, crescimento e maturação folicular é conhecido como foliculogênese (FIGUEIREDO et al., 2008). A foliculogênese inicia-se com a formação do folículo primordial e termina com a formação do folículo pré-ovulatório (PAULINI et al., 2014). É dividida em duas fases distintas: a fase pré-antral (folículos primordial, transição, primário e secundário) (SILVA et al., 2004) e a fase antral (folículos terciário e pré-ovulatório) (FIGUEIREDO et al., 2008) (Figura 1).

#### **2.1.1.2.1. Fase pré-antral**

A fase pré-antral caracteriza-se por duas etapas: 1) ativação de folículos primordiais e 2) crescimento dos folículos primários e secundários. Nessa fase, os folículos pré-antrais correspondem a cerca de 90-95% da população folicular ovariana. Os folículos primordiais, conhecidos também como folículos quiescentes,

são considerados o *pool* de estoque de folículos ovarianos (FIGUEIREDO et al., 2008). Um estudo recente demonstrou que folículos primordiais ovinos distribuem-se no ovário de forma heterogênea e sua densidade varia de acordo com as áreas distintas do mesmo córtex ovariano, entre os ovários do mesmo animal e em diferentes fêmeas ovinas (FRANSOLET et al., 2014).

**Figura 1** – Desenho esquemático da oogênese e da foliculogênese.



Fonte: Adaptado de Figueiredo et al. (2008).

O folículo primordial é caracterizado por um oócito imaturo (núcleo em prófase I) circundado por uma camada de células somáticas pavimentosas, denominadas de

células da pré-granulosa ou da granulosa (FORTUNE et al., 2013; MONNIAUX, 2016). Em ovelhas, as células da granulosa dos folículos primordiais são derivadas de células mesoteliais originadas do epitélio de superfície do ovário e do mesonéfron (MCNATTY et al., 2000; JUENGEL et al., 2002). O oócito desempenha importante papel no que diz respeito à organização folicular, pois supõe-se que o oócito controla a proliferação, diferenciação e secreção de células da granulosa. Além disso, as células da granulosa são indispensáveis ao crescimento oocitário, diferenciação, meiose, maturação citoplasmática, e controle de atividade transcricional dentro do oócito (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005; BINELLI; MURPHY, 2010). A função reprodutiva das fêmeas necessita de desenvolvimento cíclico e maturação folicular após ativação contínua de folículos primordiais que ocorre ao longo da vida reprodutiva da fêmea. Entretanto, ainda não são bem conhecidos quais os fatores necessários para a ativação e continuação do crescimento e diferenciação oocitária (TELFER; ZELINSK, 2013).

O início do crescimento folicular, denominado de ativação folicular, é caracterizado por mudança no formato das células da granulosa que passam de pavimentosas a cúbicas; proliferação celular e aumento do diâmetro oocitário (SILVA et al., 2004; ADHIKARI; LIU 2009; MONNIAUX, 2016). Sabe-se que o início do desenvolvimento do folículo primordial é fundamental para a fertilidade e aptidão reprodutiva. Nesse sentido, muitos estudos têm sido realizados para entender os mecanismos que controlam a ativação de folículos primordiais em ovelhas (SANTOS et al., 2014a; BERTOLDO et al., 2016; CAVALCANTE et al., 2016).

Estudos *in vitro* demonstraram que a ativação de folículos primordiais de ovelhas é influenciada por: Fator de Crescimento Fibroblástico-2 (FGF-2) (SANTOS et al., 2014a) sozinho ou em associação com EGF e o FSH (ESMAIELZADEH et al., 2013), bem como o Kit ligand (KL) sozinho (CAVALCANTE et al., 2016) ou associado ao Fator Neurotrófico Derivado das Células Gliais (GDNF) e FSH (ESMAIELZADEH et al., 2013). Entretanto, a Proteína Morfogenética Óssea-4 (BMP-4) não mostrou nenhuma influência na ativação de folículos primordiais ovinos (BERTOLDO et al., 2014).

Com a proliferação das células da granulosa, formando de duas ou mais camadas em volta do oócito, bem como o aparecimento das células da teca (a partir das células do estroma), têm-se a formação dos folículos secundários (MONNIAUX, 2016). As células da teca desempenham importante papel no desenvolvimento

folicular: síntese de andrógenos para conversão em estrógenos pelas células da granulosa, proporcionar comunicação entre células de granulosa e oócitos, além de fornecer suporte estrutural para o folículo à medida que progride através dos estádios de desenvolvimento para produzir um oócito maduro e fertilizável (YOUNG; MCNEILLY, 2010). Nestes folículos, também é possível observar o aparecimento da zona pelúcida (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

Nos folículos secundários, assim como nos folículos antrais, a comunicação entre as células da granulosa e o oócito é realizada por junções intercomunicantes ou junções Gap. Estas junções tem como funções a passagem de aminoácidos, nucleotídeos, hormônios, fatores de crescimento, íons inorgânicos, segundos mensageiros, entre outros (GOUGEON, 2010). Um estudo demonstrou que a Proteína Morfogenética Óssea-15 (BMP-15) está envolvida na transição de folículo primário para folículo secundário em ovinos (GALLOWAY et al., 2000). Além disso, outro estudo demonstrou que a utilização de meio de cultivo sequencial contendo FSH, EGF, GDF-9 e FGF-2 pode favorecer um aumento significativo de folículos secundários após 18 dias de cultivo de tecido ovariano ovino (PENG et al., 2010).

#### **2.1.1.2.2. Fase antral**

Os folículos antrais são divididos em: folículos terciários (antral inicial) e pré-ovulatórios (FIGUEIREDO et al., 2008; CELESTINO et al., 2009). Esse processo é caracterizado pelo crescimento, recrutamento, seleção e dominância folicular (HENNET; COMBELLES, 2012).

Com a intensa proliferação e reorganização das células da granulosa do folículo secundário, começa a ocorrer acúmulo de líquido entre elas, formando uma cavidade antral, o que caracteriza os folículos terciários (MONNIAUX, 2016). O fluido folicular é oriundo tanto da corrente sanguínea quanto de componentes secretados por células somáticas foliculares, sendo rico em substâncias, tais como esteroides, proteínas, hormônios, anticoagulantes, enzimas e eletrólitos. O fluido banha o oócito durante seu desenvolvimento e medeia a comunicação entre as células dentro dos folículos (HENNET; COMBELLES, 2012). Estudo recente demonstrou que a presença das Aquoporinas 3 e 9 parece ser essencial para a formação da cavidade antral em folículos secundários ovinos isolados cultivados *in vitro*. Os autores sugerem que a presença destes canais pode ser essencial para o fornecimento de

água e solutos, formação de fluido folicular e, conseqüentemente, desempenha um importante papel durante a foliculogênese ovina (SALES et al., 2015).

Outros autores relataram que após a formação da cavidade antral, os folículos tornam-se dependentes de gonadotrofinas, especialmente do FSH (CIFTCI, 2014). A atuação do FSH é mais direcionada às células da granulosa, estimulando a proliferação celular, a síntese de esteroides e a expressão de receptores para EGF e LH (MARTINS et al., 2008). Estudos recentes demonstraram que há um aumento significativo na formação de antro quando folículos secundários ovinos isolados são cultivados na presença do EGF (SANTOS et al., 2014b), ou na associação de LIF e FSH (LUZ et al., 2012).

Quando o folículo terciário aumenta seu diâmetro, e as suas células da granulosa se diferenciam em células do cumulus (próximas ao oócito) e em células murais (próximas à membrana basal), têm-se a formação do folículo pré-ovulatório (MAGALHÃES et al., 2009; MONNIAUX, 2016). Durante o processo de desenvolvimento folicular terminal, o oócito atinge competência para a retomada da meiose e para ser fecundado, e as células da granulosa murais sofrem maturação final e tornam-se altamente responsivas ao estrógeno e ao LH (MONNIAUX, 2016). Sendo assim, com o pico de LH, o oócito retoma a meiose, e é ovulado para posterior fecundação (DRUMMOND, 2006; MONNIAUX, 2016).

### **2.1.2. Relação entre atresia folicular, mitocôndria e estresse oxidativo**

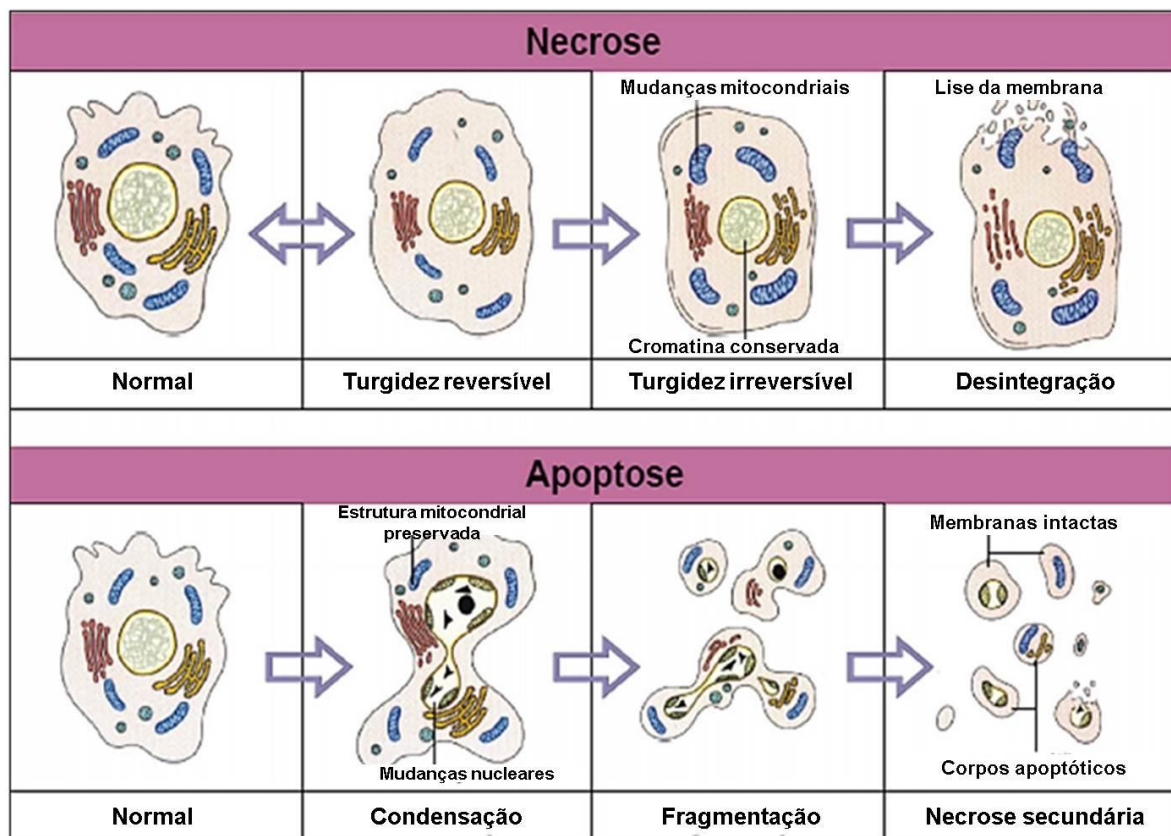
A população folicular em ovários ovinos é de 160.000 (DRIANCOURT; WEBB; FRY, 1991). No entanto, a maioria dos oócitos, cerca de 90%, está contida em folículos pré-antrais, e apenas 0,1% atinge à ovulação; o restante sofre atresia ou morte folicular (FIGUEIREDO et al., 2008). Sendo assim, a atresia folicular é o principal processo responsável pela perda folicular e oocitária (YAN et al., 2016). Inicia-se na vida pré-natal, e tem grande importância durante a vida adulta da fêmea, pois garante que apenas os folículos antrais mais saudáveis, contendo oócitos de qualidade, permanecem disponíveis durante todo o período reprodutivo para posterior fecundação (TOWNSON; COMBELLES, 2012). A atresia pode ocorrer por degeneração (necrose) e/ou apoptose (Figura 2).

A necrose ocorre devido à ação de fatores externos à célula tais como isquemia, calor ou agente tóxico. Esse tipo de morte celular inicia-se com um

comprometimento da capacidade da célula de manter a homeostase, implicando em influxo de água e íons extracelulares. As organelas intracelulares, principalmente as mitocôndrias, e toda a célula apresentam turgidez e ruptura (lise celular). Devido ao rompimento da membrana plasmática, o conteúdo citoplasmático, incluindo as enzimas, são liberadas para o fluido extracelular, que *in vivo*, é muitas vezes associada a danos extensos aos tecidos, culminando com uma intensa resposta inflamatória (SUKHOTNIK; ROFE, 2014).

A apoptose é um processo ativo mediado por genes, determinado pelo desequilíbrio entre os genes pró e anti-apoptóticos (HUSSEIN, 2005). As células apresentam alterações em níveis nuclear, especialmente em relação à cromatina, e citoplasmático, com comprometimento estrutural e funcional de organelas (BOTTONE et al., 2013). As células apresentam volume celular diminuído, condensação nuclear, fragmentação do DNA, cálcio citosólico aumentado, formação de corpos apoptóticos e membrana citoplasmática permanecendo intacta durante o estágio inicial (HONGMEI et al., 2012; SUKHOTNIK; ROFE, 2014). (Figura 2).

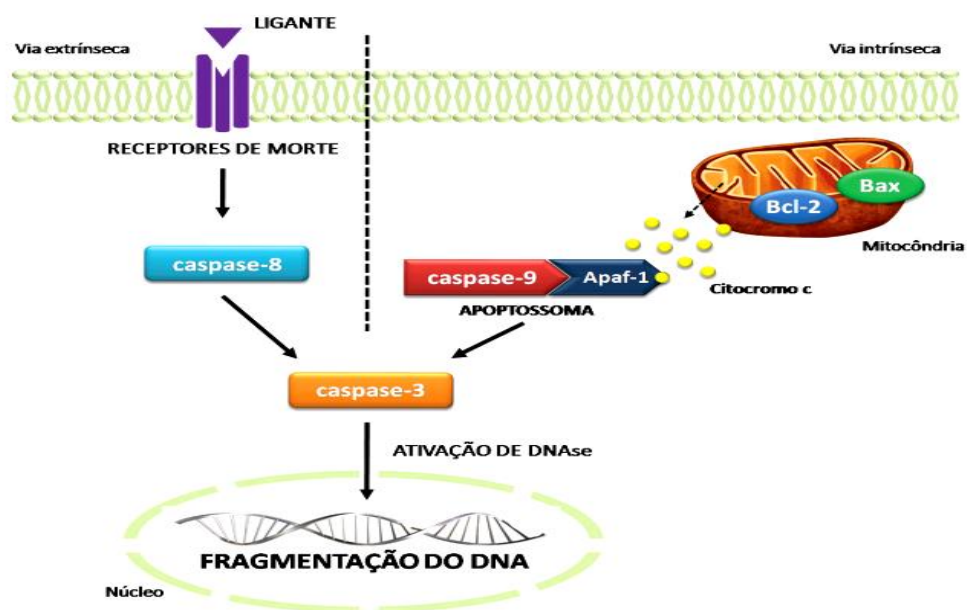
**Figura 2** - Características morfológicas de necrose e apoptose.



Fonte: Adaptado de Anazetti; Melo, (2007).

Segundo Gumus; Kilic; Zulfikaroglu (2013), até o presente momento, muitos fatores relacionados à apoptose estão envolvidos na atresia folicular, tais como os ligantes e seus receptores de morte, proteínas da família Bcl-2, Nodal (membro da família do fator de transformação do crescimento beta - TGF $\beta$ ), caspases, fatores de crescimento, gonadotrofinas e cálcio. A apoptose ocorre por duas vias: extrínseca e intrínseca (Figura 3). A via extrínseca ocorre quando receptores de morte, presente na superfície celular, são ativados pelos seus respectivos ligantes, desencadeando ativação das caspases 8 e 3, implicando na morte celular (HAPPO; STRASSER; CORY, 2012). Porém na via intrínseca, a mitocôndria é o principal mediador. A mitocôndria agrega os estímulos direcionados à morte celular, provocando a permeabilização mitocondrial com concomitante liberação de moléculas pró-apoptóticas (Bax, por exemplo) (DESAGHER; MATINOU, 2000). Sendo assim, nesta via, o citocromo c é liberado da mitocôndria para o citosol. O citocromo c irá se ligar ao Fator de ativação de protease apoptótica 1 (Apaf-1), que por sua vez, ativa a caspase-9 para a formação do complexo apoptossoma. Este complexo ativa a caspase-3, levando à morte celular (GOGVADZE; ORRENIUS; ZHIVOTOVSKY, 2006). A apoptose pode ser encontrada, principalmente, nos oócitos de folículos primordiais, e progressivamente nas células da granulosa de folículos em crescimento (BONNET et al., 2013).

**Figura 3** – Eventos apoptóticos observados nas vias extrínseca e intrínseca.



Fonte: Faustino et al., (2011).



As mitocôndrias têm o importante papel de suprir a necessidade de adenosina trifosfato (ATP) (Figura 4) durante o desenvolvimento oocitário e embrionário (WILDING et al., 2001), e assim, quando as mitocôndrias permanecem metabolicamente ativas, permitem melhores taxas de crescimento folicular, oocitário e embrionário (WANG et al., 2012; GOUVEIA et al., 2016). Entretanto, espécies reativas de oxigênio (EROs) e o estresse oxidativo, ocasionado pelo desequilíbrio entre a síntese e neutralização de EROs (THOMPSON; FRANKLIN, 2010; (MARCHI et al., 2012; LUDERER, 2014) podem desencadear a apoptose pela via intrínseca (via mitocondrial), por meio da modificação oxidativa de macromoléculas, danos na membrana celular e de organelas, como nas mitocôndrias, danos no DNA, inativação de enzimas, e por fim, a morte celular (FIERS et al., 1999; CIRCU; AW, 2010; REN et al., 2010).

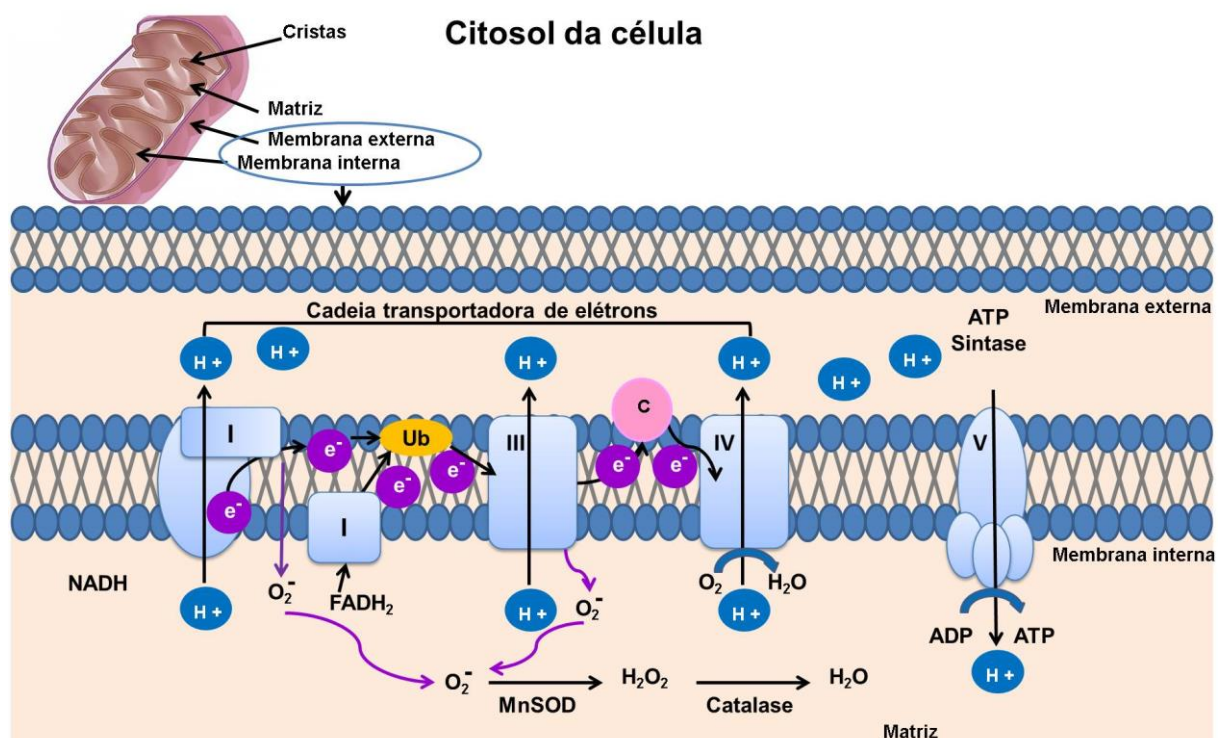
Cada vez mais tem sido mostrado que EROs estão envolvidos no início da apoptose em folículos antrais após a retirada de hormônios gonadotróficos e a exposição a produtos químicos (ftalatos, por exemplo) e radiação ionizante. Estudos também têm demonstrado efeitos protetores de antioxidantes e/ou evidência de danos oxidativos na atresia de folículos primordiais e primários, sugerindo que EROs podem desempenhar papel negativo em folículos pré-antrais. Além disso, danos oxidativos aos lipídios no oócito têm sido considerados como causa de qualidade oocitária persistentemente baixa após a exposição precoce às diversas substâncias tóxicas, e que o desenvolvimento de células germinativas ovarianas durante a vida fetal também têm demonstrado ser sensível a substâncias tóxicas e radiação, que induzem o estresse oxidativo (LUDERER, 2014).

As EROs são produzidas a partir do oxigênio molecular como resultado do metabolismo natural das células (AGARWAL et al., 2003; CIRCU; AW, 2010; BIRBEN et al., 2012), geradas principalmente como subprodutos da respiração mitocondrial (CUI; KONG; SHANG, 2012; YU; BENNETT, 2014). A cadeia de transporte de elétrons recebe elétrons ( $e^-$ ) de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzida (NADH) e do Dinucleotídeo de flavina e adenina reduzido (FADH<sub>2</sub>) e medeia a transferência de elétrons do complexo I para o complexo IV, via ubiquinona (Ub) e citocromo c (C). No complexo IV, os elétrons reduzem o oxigênio molecular para formação de molécula de água. À medida que os elétrons são transportados, um gradiente de próton ( $H^+$ ) é criado através da membrana

mitocondrial interna (MMI). O Complexo V (ATP sintase) utiliza este gradiente para converter adenosina difosfato (ADP) a ATP (YU; BENNETT, 2014). As três principais EROs que são de significado fisiológico são ânion superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxila ( $\cdot OH$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (BIRBEN et al., 2012).  $O_2^-$  é formado nos complexos I e III e é convertido à  $H_2O_2$  pela matriz de manganês superóxido dismutase (MnSOD). O  $H_2O_2$  poderá ser reduzido à água pela catalase ou glutatona peroxidase (GSH-Px) (YU; BENNETT, 2014) (Figura 4).

As EROs, em baixas concentrações, são consideradas importantes mensageiros intracelulares para diferentes funções fisiológicas (AGARWAL et al., 2003; CIRCU; AW, 2010). Para isso, a célula precisa estar em homeostase, a qual é conseguida através de um equilíbrio entre compostos pró-oxidantes (íons metais e EROs, por exemplo) e antioxidantes (GUPTA e tal., 2010).

**Figura 4 -** Cadeia respiratória mitocondrial.



Fonte: Adaptado de Yu; Bennett, 2014.

Os antioxidantes são substâncias que atuam na redução do estresse oxidativo (BHATTACHARYY et al., 2014). São considerados agentes antioxidantes presentes nos tecidos corporais, inclusive no ovário mamífero: 1) enzimas que removem cataliticamente radicais e espécies reativas, como por ex., as enzimas

superóxido dismutase (SOD), glutathiona redutase, glutathiona peroxidase (GSH-Px) e catalases; 2) proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes (íons ferro e íons cobre), como por ex., as transferrinas, ferritinas, metalotioneínas e haptoglobinas; 3) proteínas que protegem processos celulares contra danos oxidativos através de mecanismos não enzimáticos, como por ex., as proteínas de estresse; 4) moléculas de baixo peso molecular que possuem a capacidade de captar EROs via auto-oxidação, como por ex., glutathiona e aquelas que possuem grupo tiol (SH), ou 5) vitaminas como  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico e caroteno (BERRA; MENCK, 2006; DEVINE; PERREAULT; LUDERER, 2012; BHATTACHARYY et al., 2014; MENG et al., 2016).

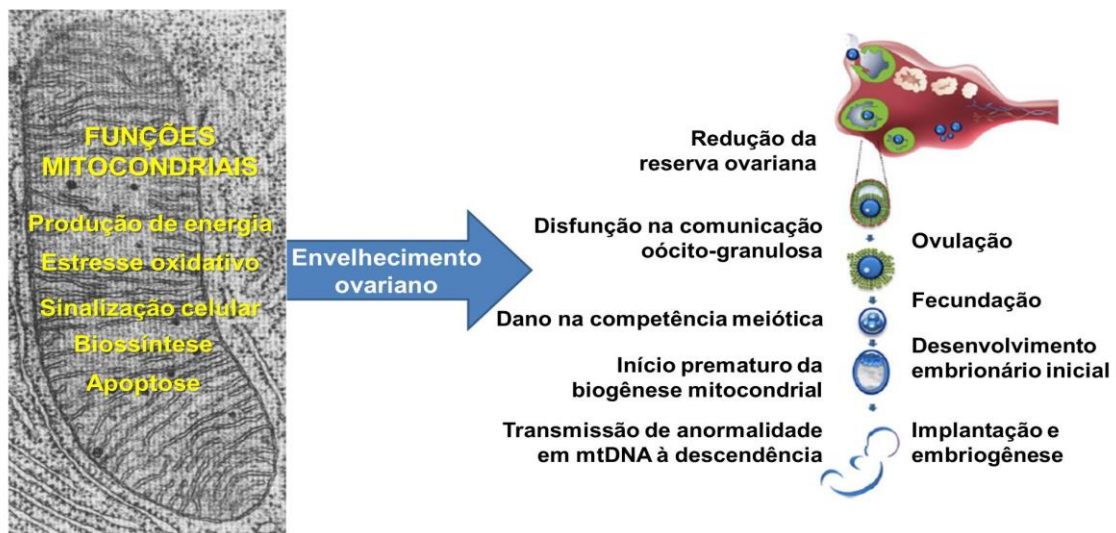
As enzimas SOD, GSH-Px e catalase são envolvidas na proteção das células contra danos celulares causados, respectivamente, pelo  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  (BHATTACHARYY et al., 2014) (Figura 4). A glutathiona é composta pelos aminoácidos glutamato, cisteína e glicina, sendo encontrada em todas as células eucaróticas e é um dos principais antioxidantes não enzimáticos. Está geralmente presente na célula como uma mistura de sua forma reduzida, GSH, e sua forma dimérica ligada a dissulfeto, GSSG, e juntamente às enzimas GSH-Px e glutathiona S-transferase (BACHHAWAT et al., 2013; BHATTACHARYY et al., 2014).

Especula-se que o dano cumulativo às mitocôndrias e ao DNA mitocondrial (mtDNA) causado por EROs é uma das causas do envelhecimento celular. O dano oxidativo afeta a replicação e a transcrição do mtDNA e resulta em um declínio na função mitocondrial que, por sua vez, leva a uma produção aumentada de EROS e a mais danos ao mtDNA (CUI; KONG; SHANG, 2012). Sendo assim, em mamíferos, há uma estreita relação entre mitocôndrias e o declínio da qualidade oocitária durante o envelhecimento ovariano. Qualitativamente, com a instabilidade do DNA, durante o envelhecimento mitocondrial, ocorre um acúmulo de mutações do mtDNA, que causa redução da competência oocitária, declínio da reserva ovariana e o risco de transmissão de anormalidades mitocondriais para a prole. Quantitativamente, a biogênese mitocondrial é crucial durante a oogenesis para a constituição de uma reserva mitocondrial suficientemente grande para permitir desenvolvimento embrionário inicial normal e para evitar a ativação prematura da biogênese mitocondrial. Além disso, o envelhecimento ovariano também afeta seriamente a natureza dinâmica em torno da biogênese mitocondrial nas células da granulosa,

que podem fornecer biomarcadores alternativos interessantes da qualidade do oócito (MAY-PANLOUP et al., 2016) (Figura 5).

Sabendo-se da grande perda folicular, que ocorrem naturalmente *in vivo*, e que o excesso de EROs pode causar danos celulares e mitocondriais, e por fim a atresia folicular, vem sendo aprimoradas biotécnicas reprodutivas, tais como a Biotécnica de Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais (MOIFOPA).

**Figura 5** - Visão geral de múltiplas implicações da mitocôndria no envelhecimento ovariano e suas consequências deletérias sobre a função reprodutiva.



Fonte: Adaptado de May-Panpaloup et al. (2016).

### 2.1.3. MOIFOPA

A MOIFOPA, também conhecida como “ovário artificial”, é uma biotécnica que tem como objetivos o isolamento, a conservação (resfriamento ou criopreservação) e/ou cultivo de folículos ovarianos pré-antrais para possibilitar que os seus oócitos imaturos tornem-se maduros e aptos à fecundação *in vitro*, evitando a atresia (FIGUEIREDO et al., 2008).

#### 2.1.3.1. Aplicações da MOIFOPA em ovários ovinos

Em relação à produção de embriões ovinos a partir de oócitos obtidos após o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, os resultados ainda não são satisfatórios

(ARUNAKUMARI; SHANMUGASUNDARAM; RAO, 2010; LUZ et al., 2012). Isto se deve ao fato da fase pré-antral ser complexa e muitos de seus mecanismos ainda não serem elucidados (FIGUEIREDO et al., 2008). Além do mais, ao contrário dos oócitos de folículos antrais, os oócitos de folículos pré-antrais necessitam de longo período de cultivo para alcançar o crescimento *in vitro* e posterior desenvolvimento de sua competência (PICTON, 2008).

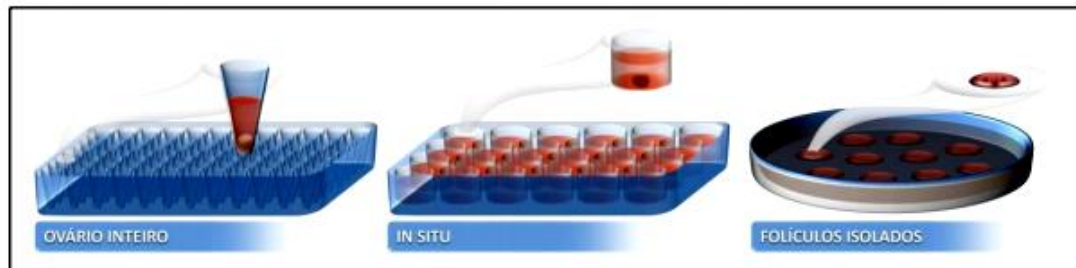
No que diz respeito à criopreservação ovariana em ovelhas, estudos demonstraram que é possível obter nascidos vivos após o transplante de ovário inteiro (IMHOF et al., 2006) e de tecido ovariano (SALLE et al., 2002; 2003) criopreservados. Nesse sentido, no tocante à medicina veterinária, a criopreservação pode contribuir para a composição de banco de germoplasma de animais de alto valor zootécnico (FIGUEIREDO et al., 2008). Além disso, devido à região cortical ovariana ovina apresentar grande quantidade de fibra colágena, com distribuição de folículos primordiais similar ao ovário humano, o ovário ovino tem sido considerado um modelo adequado para estudos em humanos, e por isso, vários estudos utilizaram o tecido ovariano (GOSDEN et al., 1994; LONARGE et al., 2006; SAUVAT et al., 2013; FRANSOLETT et al., 2014) ou o folículo isolado (vitrificado e cultivado) (LUNARDI et al., 2015).

### **2.1.3.2. Tipos e sistemas de cultivo de folículos pré-antrais**

Na tentativa de otimizar o potencial reprodutivo das fêmeas mamíferas, folículos ovarianos vem sendo cultivados inclusos em ovário inteiro ou fragmentos do córtex ovariano (*in situ*) ou isolados (SOUZA, 2013) (Figura 6). Devido ao tamanho do ovário ovino, o cultivo folicular é realizado apenas em fragmentos do córtex ovariano ou de forma isolada. Dentre esses, o cultivo de folículos pré-antrais isolados de ovários ovinos tem sido utilizado para testar diferentes substâncias sozinhas ou em associação, períodos de cultivo, viabilidade após processo de criopreservação, monitoramento do folículo durante todo o cultivo, bem como de sistemas de cultivo (LUZ et al., 2012; LUNARDI et al., 2015; KAMALAMMA et al., 2016; SADEGHNIA et al., 2016). O isolamento folicular tem sido realizado, preferencialmente, mecanicamente, ou seja, manualmente com auxílio de agulhas de 26 G acopladas a seringas de 1 mL, pois diferentemente do isolamento por ação

enzimática, proporciona a recuperação de mais folículos normais (ARAÚJO et al., 2014).

**Figura 6** - Desenho representativo dos tipos de cultivo *in vitro* de folículo ovariano.



Fonte: Souza, (2013).

Os sistemas de cultivo são do tipo bidimensional (2D) ou tridimensional (3D). No sistema 2D, o folículo pode ser cultivado diretamente sobre uma superfície plástica (placa de petri, por exemplo) ou sobre uma matriz extracelular composta, por exemplo, de colágeno ou matrigel ou de células somáticas (Figura 7A). Em cultivo 3D, o folículo é envolto por uma matriz extracelular, que pode ser alginato, colágeno ou ágar gel (Figura 7B) (ARAÚJO et al., 2014).

**Figura 7** - Representação esquemática dos sistemas de cultivos bi e tridimensionais.



Fonte: Adaptado de Araújo et al., (2014).

Cabe ressaltar que o cultivo de folículo secundário isolado, em sistema 2D (diretamente sobre placa de petri) tem merecido destaque, pois até o momento, foi o

único a permitir a produção de embriões ovinos *in vitro* (ARUNAKUMARI; SHANMUGASUNDARAM; RAO, 2010; LUZ et al., 2012; LUZ et al., 2013).

### **2.1.3.3. Meio de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais e antioxidantes**

Para melhor desenvolvimento de folículos secundários ovinos isolados *in vitro* em sistema 2D, têm-se utilizado, rotineiramente, meios comerciais, tais como o Meio Essencial Mínimo – alfa modificado ( $\alpha$ -MEM) e o Meio de Cultivo de Tecido 199 (TCM 199), suplementados com hormônios (insulina), substâncias energéticas (glutamina e hipoxantina) e proteicas (albumina sérica bovina – BSA) e/ou antioxidantes (selênio, transferrina e ácido ascórbico) (SANTOS et al., 2014b; KAMALAMMA, et al. 2016). Devido às condições do cultivo *in vitro*, como por exemplo, composição do meio de cultivo, luz e concentração de O<sub>2</sub> (ZAVAREH; TALEBI; HASANZADEH, 2015), ocorre a produção de altos níveis de EROs durante o metabolismo folicular (ABEDELAAHI et al., 2010). Na tentativa de reduzir os danos celulares ocasionados pelo excesso de EROs, justifica-se a adição de substâncias antioxidantes, tais como, o selênio (selenito de sódio), a transferrina e o ácido ascórbico, ao meio de cultivo folicular (DURLEJ et al., 2008; KERR et al., 2012; ABEDELAAHI et al., 2010; SILVA et al., 2011; LUZ et al., 2013; SANTOS et al., 2014b).

O selênio é um micronutriente essencial que é incorporado a inúmeras proteínas selênio-dependentes, como, por exemplo, a GSH-Px, desempenhando importantes funções antioxidantes (BARRET; SHORT; WILLIAMS, et al., 2016; VEGA et al., 2016). Estudos mostraram que a sua forma ativa, selenito de sódio, aumentou as taxas de maturação oocitária e de produção de embriões após o cultivo de folículos pré-antrais murinos, através da redução dos níveis de EROs e do aumento da capacidade antioxidante total (CAT) e da enzima GSH-Px (ABEDELAAHI et al., 2010).

A transferrina é um quelante, que além de transportar o ferro dentro da célula, remove metais tóxicos presentes no meio de cultivo (BARNES; SATO, 1980; CÓRDOVA et al., 2010), sendo fundamental, *in vitro*, para a diferenciação de células da granulosa cultivadas de folículos imaturos suínos (DURLEJ et al., 2008).

A ação antioxidante do ácido ascórbico ou vitamina C, em processos de oxidação celular, ocorre através da redução nos níveis de EROs e do aumento nos



níveis intracelulares de GSH (LUTSENKO; CÁRCAMO; GOLDE, 2002; KERE et al., 2013). Estudos recentes demonstraram que a suplementação do meio de cultivo *in vitro* com esse antioxidante promove o desenvolvimento folicular após o cultivo de fragmentos ovarianos caprinos, bovinos e equinos (SILVA et al., 2011; ANDRADE et al., 2012; GOMES et al., 2015).

Além desses antioxidantes (selênio, transferrina e ácido ascórbico), outros vêm sendo testados no cultivo de folículos ovarianos pré-antrais. A adição do extrato do pólen da palmeira (*Phoenix dactylifera*) ao meio de cultivo de folículos secundários isolados murinos favoreceu a obtenção de altas taxas de crescimento folicular e de maturação oocitária (ABDOLLAHI et al., 2015). O ácido  $\alpha$ -lipóico promoveu o desenvolvimento folicular, oocitário e embrionário após o cultivo de folículos pré-antrais murinos por meio da redução de EROs e do aumento da capacidade antioxidante total (CAT) (TALEBI et al., 2012). Em estudo recente, o composto Anetole, aumentou a retomada da meiose de oócitos caprinos de folículos secundários crescidos *in vitro*, e diminuiu os níveis de EROs (SÁ et al., 2015). Outro estudo recente, mostrou que a suplementação do meio com a coenzima Q10 (CoQ10) melhorou os níveis de CAT e o desenvolvimento de folículos pré-antrais vitrificados em murinos (KASHKA; ZAVAREH; LASHKARBOLUKI, 2015).

Recentemente, visando reduzir os custos para aquisição dos meios de cultivo, bem como para os suplementos antioxidantes adicionados a esses, nossa equipe vêm testando o extrato da planta medicinal *Amburana cearensis*, planta nativa da Caatinga, como meio alternativo.

A *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith (Fabaceae) é uma árvore popularmente conhecida no Nordeste Brasileiro como "Cumaru", "Amburana", "Amburana de cheiro", "Emburana de cheiro" ou "Umburana" (ALBUQUERQUE et al., 2007). É uma das espécies nativas da caatinga mais indicada pela população local para fins terapêuticos. A planta *A. cearensis* é utilizada como xarope, chá, pó e "balas" no tratamento de doenças do sistema respiratório (sinusites) e digestório (prisão de ventre) (ROQUE; ROCHA; LOIOLA, 2010; LUCENA et al., 2013). Esta planta tem sido bastante estudada devido aos seus efeitos antimicrobianos, anti-inflamatório, broncodilatador, analgésico e antioxidante (ALBUQUERQUE et al., 2007; LEAL et al., 2010).

O primeiro estudo realizado por nossa equipe verificou o efeito do extrato *A. cearensis* na conservação de tecido ovariano caprino. Este estudo mostrou que o

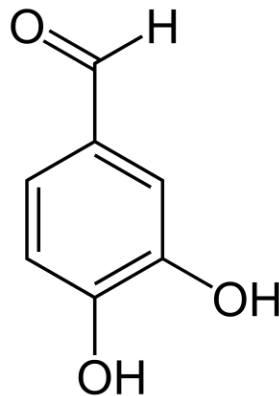


extrato desta planta diluído em solução salina, na concentração de 0,2 mg/mL, manteve a percentagem de folículos pré-antrais caprinos morfológicamente normais e baixas taxas de apoptose de forma semelhante ao meio comercial (MEM), após 6 horas de conservação a 4°C (GOUVEIA et al., 2015). Em relação ao cultivo folicular *in vitro*, o extrato, na concentração de 0,1 mg/mL, sem adição de suplementos, manteve a sobrevivência e promoveu o desenvolvimento *in vitro* após 18 dias de cultivo de folículos secundários isolados de ovinos quando comparado ao meio controle ( $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>) (BARBERINO et al., 2016). Além disso, em outro estudo, o extrato da *A. cearensis*, utilizado como meio de cultivo, na concentração de 0,2 mg/mL, adicionado de suplementos e FSH melhorou o crescimento, os níveis de GSH e a atividade mitocondrial após 12 dias de cultivo de folículos secundários isolados de caprinos (GOUVEIA et al., 2016). Estes resultados ocorreram, provavelmente, devido a presença dos compostos ácido protocatecuico, ácido gálico, kaempferol, ácido *p*-cumárico e epicatequina (GOUVEIA et al., 2015) no extrato da planta, mais especificamente, do ácido protocatecuico, o qual foi encontrado em maior concentração nesse extrato. Estas substâncias têm demonstrado importante papel antioxidante (SHIN et al., 2014; PEI et al., 2016; SUCHAL et al., 2016; THAKARE; DHAKANE; PATEL, 2016).

#### 2.1.4. Ácido protocatecuico

O ácido protocatecuico (PCA, ácido 3,4-di-hidroxibenzóico) (Figura 8) é um composto fenólico natural, encontrado em verduras, frutas, legumes e plantas medicinais (LIN et al., 2003; CHAN et al., 2004; KAKKAR; BAIS, 2014; GOUVEIA et al., 2015). É composto por um anel aromático, dois grupos hidroxila e um grupo carboxila, assemelhando-se estruturalmente aos ácidos gálico, cafeico, vanílico e siríngico. Em pressão atmosférica de 760 mm de Hg, o PCA possui pontos de ebulição e fusão de 410°C e 210°C, respectivamente. É solúvel em álcool, éter e moderadamente solúvel em água na proporção de 1: 50 (KAKKAR; BAIS, 2014), ou solúvel em água a 100 mM (ABCAM PRODUCT DATASHEET, 2015).

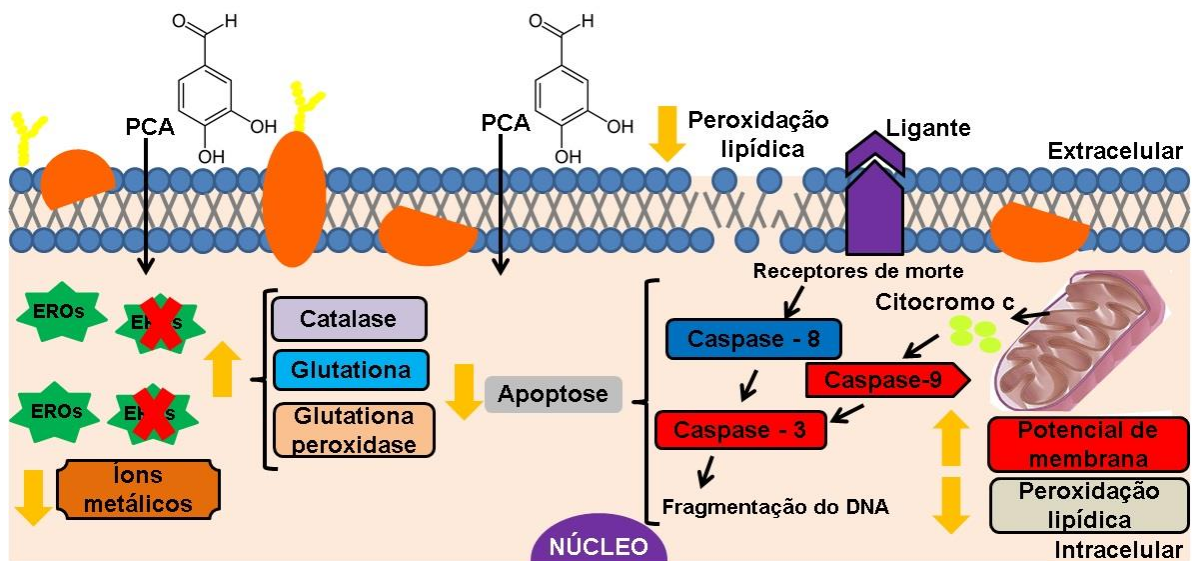
**Figura 8** - Estrutura química do ácido protocatecuico (PCA).



Fonte: Kakkar; Bais (2014).

O PCA tem sido bastante estudado devido ao seu potencial neuroprotetor, cardioprotetor, antibacteriano, anticancerígeno, antidiabético, antiviral, analgésico, anti-inflamatório e antioxidante (KAKKAR; BAIS, 2014). A atividade antioxidante do PCA é atribuída à energia de dissociação dos grupos OH, devido à facilidade de perda do próton, e pode estar relacionada ao seu processo de degradação, por oxidação ou ionização (HATZIPANAYIOTTI et al., 2006). Esta ação antioxidante do PCA foi determinada *in vitro* por meio da quelação de íons metálicos e eliminação de EROs (LI et al., 2011). Em ratos, o PCA promoveu a diferenciação e reduziu a apoptose de células neuronais cultivadas *in vitro* através da redução nos níveis de EROs e aumento da atividade da enzima catalase (CAT) (GUAN et al., 2011). Autores demonstraram que o PCA atenua o estresse oxidativo induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em células PC12 de ratos através do aumento nos níveis de GSH (GUAN et al., 2006b) e de glutathiona peroxidase (SHI et al., 2006). Além disso, em relação às membranas celular ou mitocondrial, o PCA preveniu a disfunção no potencial de membrana mitocondrial de células PC12 expostas ou não ao 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP<sup>+</sup>; neurotoxina) (AN et al. 2006; GUAN et al. 2006a), e inibiu a peroxidação lipídica de membranas plasmáticas de hepatócitos e hemólise induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em eritrócitos de ratos (LIU et al., 1992) (Figura 9).

**Figura 9 – Mecanismos de ação do ácido protocatecuico (PCA).**



Fonte: Arquivo pessoal.

Estudos recentes demonstraram que o PCA atua como cardioprotetor ao reduzir a taxa de apoptose e inibir a expressão da caspase-3 ativada em cardiomiócitos de ratos *in vitro* (TANG et al., 2015), e ao inibir a expressão do ligante Fas, receptor de morte Fas, Domínio de morte associado ao Fas (FADD), Bid, t-Bid, Bax, citocromo *c*, caspase-8, caspase-9 e caspase-3 ativadas (Figura 9). Além disso, o PCA diminuiu os achados histopatológicos em testículos de ratos após estresse oxidativo por 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD) (BEYTUR et al., 2012). Um estudo recente demonstrou que o PCA aumentou a expressão de proteínas pró-sobrevivência como o Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 1 (IGF1), e seu receptor (IGF1R), p-PI3K, P-Akt, Bcl-x, e Bcl-2 em coração de ratos hipertensos tratados durante oito semanas com este polifenol, quando comparado aos hipertensos não tratados (DENG et al., 2014). O PCA também aumentou a proliferação *in vitro* de células-tronco neurais de ratos (GUAN et al., 2009) e de condrócitos articulares de coelho (LUO et al., 2015).

Autores também demonstraram que o PCA tem um potencial quimioterápico, dependendo da concentração utilizada, ao atuar seletivamente contra células cancerígenas humanas, devido à diminuição do potencial de membrana mitocondrial, redução da atividade da  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase, aumento das caspases-3 e 8 ativadas, e fragmentação do DNA em células de câncer de pulmão, fígado, colo do

útero, mama e próstata, sem causar danos à membrana e sobrevivência de células não cancerígenas do pulmão, mama e próstata (YIN et al., 2009; SEMAMING et al., 2015).

Entretanto, apesar do potencial antioxidante mostrado em estudos prévios, ainda não há estudos *in vitro* relacionando o ácido protocatecuico e o cultivo de oócitos inclusos em folículos secundários ovinos isolados.

### 3. JUSTIFICATIVA

A criação de ovinos no semiárido nordestino é favorecida pela capacidade de adaptação destes animais às condições ambientais locais, permitindo uma produção significativa de carne e pele, contribuindo para o desenvolvimento social e econômico da população local, principalmente, na renda familiar dos produtores rurais. Diante disso, diversas biotécnicas reprodutivas vêm sendo aprimoradas. Dentre estas, destaca-se a MOIFOPA, que busca entender os mecanismos envolvidos na foliculogênese inicial, e futuramente, aumentar o potencial reprodutivo desta espécie através do resgate, conservação, cultivo e posterior maturação *in vitro* de oócitos inclusos em folículos pré-antrais ovinos, evitando a atresia folicular.

Sabe-se que alguns fatores tornam a MOIFOPA onerosa, como por exemplo, o meio utilizado para o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos, bem como as substâncias utilizadas para a suplementação deste meio. Por outro lado, vários estudos já mostraram que os antioxidantes são necessários como suplementos no meio de cultivo para minimizar os danos foliculares causados pelo estresse oxidativo. Neste sentido, buscando reduzir os custos com as pesquisas, nossa equipe têm desenvolvido trabalhos com o extrato de *Amburana cearensis*, planta nativa da Caatinga, o qual tem sido bastante estudado devido aos seus efeitos antioxidantes. O extrato de *A. cearensis* manteve a sobrevivência e promoveu o desenvolvimento *in vitro* de folículos secundários isolados de ovinos e caprinos. Isto ocorreu, provavelmente, devido à ação do ácido protocatecuico (PCA), constituinte químico encontrado em maior concentração neste extrato.

O PCA é um composto natural que tem apresentado importante efeito citoprotetor em diferentes tipos de células, reduzindo o estresse oxidativo e a apoptose, e favorecendo a sobrevivência e a proliferação celular. Diante disto, a utilização deste composto, como único antioxidante adicionado ao meio de cultivo, em substituição a três antioxidantes (selênio, ácido ascórbico e transferrina), poderia favorecer a sobrevivência, o desenvolvimento folicular e a obtenção de oócitos viáveis para maturação e posterior fertilização *in vitro*. Além de uma maior praticidade, a adição do PCA ao meio de cultivo de base também poderia agregar valor à *A. cearensis* devido à possibilidade de sua obtenção a partir deste extrato, o que no futuro, poderia auxiliar na redução de custos desta biotécnica reprodutiva.

#### 4. HIPÓTESE CIENTÍFICA

A adição do ácido protocatecuico, em meio isento de antioxidante, mantém a sobrevivência e promove o desenvolvimento *in vitro* de oócitos inclusos em folículos secundários ovinos isolados cultivados durante 12 dias.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo Geral

Estudar o efeito do ácido protocatecuico sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos secundários ovinos isolados.

### 5.2 Objetivos Específicos

Verificar o efeito de diferentes concentrações (56,25; 112,5; 225; 450 ou 900 µg/mL) do ácido protocatecuico, adicionado ao meio de cultivo isento de antioxidante, em comparação ao meio de cultivo adicionado de antioxidantes (transferrina, selênio e ácido ascórbico), sobre:

- 1) A morfologia, a formação de antro e o crescimento folicular
- 2) Os níveis intracelulares de glutathione (GSH)
- 3) Mitocôndrias ativas
- 4) Retomada da meiose
- 5) Fragmentação de DNA de oócitos inclusos em folículos secundários ovinos isolados cultivados *in vitro* ao longo de 12 dias.

## 6. CAPÍTULO 1

### **Use of protocatechuic acid as the sole antioxidant in the base medium for *in vitro* culture of ovine isolated secondary follicles**

(Utilização do ácido protocatecuico como único antioxidante no meio base para o cultivo *in vitro* de folículos secundários ovinos isolados)

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

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

(Submetido para publicação no periódico *Reproduction in Domestic Animals*)



**Use of protocatechuic acid as the sole antioxidant in the base medium for *in vitro* culture of ovine isolated secondary follicles**

VG Menezes<sup>a</sup>, JMS Santos<sup>a</sup>, TJS Macedo<sup>a</sup>, TLBG Lins<sup>a</sup>, RS Barberino<sup>a</sup>, BB Gouveia<sup>a</sup>, MÉ.S. Bezerra<sup>a</sup>, AYP Cavalcante<sup>a</sup>, MAA Queiroz<sup>b</sup>, RC Palheta Jr<sup>c</sup>, MHT Matos<sup>a\*</sup>

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

<sup>b</sup>Laboratory of Bromatology and Animal Nutrition, Federal University of São Francisco Valley, Petrolina, PE, Brazil

<sup>c</sup>Laboratory of Pharmacology, Federal University of São Francisco Valley, Petrolina, PE, Brazil

**Running head:** Effect of PCA on ovine secondary follicle culture

\*Correspondence should be addressed to:

Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF)

Campus de Ciências Agrárias. Colegiado de Medicina Veterinária - Laboratório de Biologia Celular, Citologia e Histologia.

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

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

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

## Abstract

The present study evaluated the effect of the protocatechuic acid (PCA) as the sole antioxidant in the base medium for *in vitro* culture of ovine secondary follicles. Secondary follicles (200-230  $\mu\text{m}$ ) were isolated and cultured in  $\alpha$ -Minimal Essential Medium supplemented with BSA, insulin, glutamine and hypoxanthine ( $\alpha$ -MEM: antioxidant free-medium) or  $\alpha$ -MEM also added by transferrin, selenium and ascorbic acid ( $\alpha$ -MEM+: with antioxidant) or  $\alpha$ -MEM added by PCA (56.25; 112.5; 225; 450 or 900  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Moreover, after culture, oocytes were matured and the chromatin configuration and DNA fragmentation were evaluated. After 12 days, the treatment containing 56.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PCA showed higher percentage of normal follicles than control medium or the other treatments ( $P < 0.05$ ), except for 900  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PCA ( $P > 0.05$ ). The antrum formation was significantly higher in treatments containing 56.25; 112.5 or 900  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PCA, compared to the  $\alpha$ -MEM and similar ( $P > 0.05$ ) to the other treatments. The rates of fully grown oocytes ( $\geq 110$   $\mu\text{m}$ ) were similar ( $P > 0.05$ ) among all treatments containing PCA and  $\alpha$ -MEM+, and those were superior ( $P < 0.05$ ) than  $\alpha$ -MEM, except for 450  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PCA ( $P > 0.05$ ). GSH levels and mitochondrial activity were higher ( $P < 0.05$ ) in  $\alpha$ -MEM+ compared to the  $\alpha$ -MEM and similar ( $P > 0.05$ ) to all PCA treatments. The rates of meiotic resumption and DNA fragmentation were similar ( $P > 0.05$ ) among  $\alpha$ -MEM+ and 56.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PCA. In conclusion, PCA at 56.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  as the sole antioxidant added to the medium for ovine isolated secondary follicle culture maintains follicular survival, GSH and active mitochondria levels, meiotic developmental competence and DNA integrity of cultured oocytes.

**Keywords:** Phenolic compound, Oocyte, Viability, GSH, Mitochondria

## Introduction

The *in vitro* culture of secondary follicles could be a good strategy to increase the production of meiotically competent oocytes (Silva et al. 2016) besides providing a contribution to our understanding of ovarian folliculogenesis (Arunakumari et al. 2010). However, the number of ovine embryos produced from *in vitro* ovine isolated secondary follicles is still unsatisfactory (Arunakumari et al. 2010; Luz et al. 2012). One of the factors that may contribute to these results is oxidative stress.

Studies have shown that *in vitro* conditions for the culture of ovarian follicles, oocytes and embryos can affect oxidative homeostasis, increasing the reactive oxygen species (ROS) levels, causing damage to the cell membranes and to DNA, inactivation of enzymes and finally cell death (Circu and Aw 2010; Succu et al. 2014; Sá et al. 2015). Therefore, the addition of antioxidant substances to the *in vitro* culture medium improves cellular development through the balance between ROS and the antioxidant system (Abedelahi et al. 2010; Talebi et al. 2012). Some antioxidants such as selenium, transferrin and ascorbic acid have been commonly added to the base culture medium of ovine ovarian follicles (Luz et al. 2012; 2013; Santos et al. 2014; Barberino et al. 2016). Recently, a substance that has demonstrated important antioxidant action is protocatechuic acid (Guan et al. 2006a; Li et al. 2011).

Protocatechuic acid (PCA, 3,4-dihydroxybenzoic acid) is a natural phenolic compound found in vegetables, grains, fruits and medicinal plants (Lin et al. 2003; Kakkar and Bais 2014; Gouveia et al. 2015). *In vitro* studies have demonstrated that PCA exert its antioxidant action through metal ion chelation, elimination of ROS and increase in the levels of antioxidant factors like total glutathione and catalase (Guan et al. 2006a; Guan et al. 2011; Li et al. 2011). PCA at 0,006 mM (approximately 900 µg/mL) maintained the proliferation of rat neural cells (Guan et al. 2009) and at 50, 100, 150 or 200 µg/mL, PCA prevented loss of PC12 cells (adrenal gland; heochromocytoma) viability after exposure to hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Shi et al. 2006). Moreover, PCA promoted *in vitro* proliferation of rabbit articular chondrocytes (Luo et al. 2015). Little is known about the effects of PCA on mammalian reproduction. PCA exerted cytoprotective actions by decreasing the histopathological findings in rat testis exposed to the oxidative stress induced by the toxin 2,3,7,8-

tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) (Beytur et al. 2012). However, there is no report on the effect of PCA on the *in vitro* culture of ovarian follicles.

Knowing that at excessive concentration, antioxidant agents may act as pro-oxidants (Talebi et al. 2012), the aim of the present study was to evaluate the effect of different concentrations of PCA as the sole antioxidant added to the culture medium in comparison to the medium supplemented with three antioxidants typically used (transferrin, selenium and ascorbic acid) on the morphology, development, the levels of GSH and active mitochondria, meiotic resumption and DNA fragmentation of ovine secondary follicles cultured *in vitro*.

## **Material and methods**

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

### **Source of ovaries**

This experiment was conducted according to the ethical guidelines of the Ethics 99 Committee on Animal Use at the Federal University of San Francisco Valley (protocol 100 number 0002/170516).

Ovaries (n = 120) were collected at a local abattoir from 60 adult mixed-breed sheep. Immediately postmortem, pairs of ovaries were washed once in 70% alcohol and then twice in Minimum Essential Medium buffered with HEPES (MEM-HEPES) and supplemented with antibiotics (100 µg/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin). Next, the ovaries were transported within 1 h to the laboratory in tubes containing MEM-HEPES with antibiotics at 4 °C.

### **Isolation and selection of ovine secondary follicles**

Isolation, selection, culture and follicular evaluation were performed according to Gouveia et al. (2016). 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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{L}$  droplets containing base culture medium for the evaluation of quality. Only follicles that displayed the following characteristics were selected for culture: an intact basement membrane, two or more layers of granulosa cells and a visible and healthy oocyte that was round and centrally located within the follicle, without dark cytoplasm. Isolated follicles were pooled and then randomly allocated to the treatment groups, with approximately 55 follicles per group.

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

After selection, the follicles were randomly divided into eight study groups and individually cultured (one follicle per droplet) in 100  $\mu\text{L}$  droplets of culture medium under mineral oil in petri dishes (60 x 15 mm, Corning, USA). The base control medium consisted of  $\alpha$ -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  $\alpha$ -MEM). To verify the effect of the antioxidants generally used, this medium was also added by 5.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  transferrin, 5.0 ng/mL selenium and 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ascorbic acid (medium containing antioxidants, called  $\alpha$ -MEM+). Moreover, to verify the effects of PCA as the sole antioxidant present in the medium, different concentrations of PCA (56.25; 112.5; 225; 450 or 900  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were added to the control medium ( $\alpha$ -MEM; without antioxidants) (Fig. 1). The concentrations of PCA were chosen based on previous studies (Shi et al. 2006; Guan et al. 2009; Gouveia et al. 2015). All follicles were cultured at 39°C under 5%  $\text{CO}_2$  for up to 12 days. Every 2 days, in all treatments, 60  $\mu\text{L}$  of the culture media was replaced with fresh media.

## **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 atresia were classified as morphologically normal follicles. Follicular atresia was recognized when a darkening of the oocytes and surrounding cumulus cells or misshapen oocytes was noted. The rupture of the basement membrane was also observed and characterized as oocyte extrusion. The following characteristics were analyzed in the morphologically normal follicles: (i) antral cavity formation, defined as the emergence of a visible translucent cavity within the granulosa cell layers, (ii) the diameter of healthy follicles, measured from the basement membrane, which included two perpendicular measurements of each follicle, and (iii) the daily growth rate, calculated as the diameter variation during the culture period (12 days). In addition, after 12 days of culture, all healthy follicles were mechanically opened with 26 G needles under a stereomicroscope for oocyte recovery. The percentage of fully grown oocytes, i.e., oocyte  $\geq 110 \mu\text{m}$ , was calculated as the number of acceptable quality oocytes ( $\geq 110 \mu\text{m}$ ) recovered out of the total number of cultured follicles ( $\times 100$ ).

## **Assessment of GSH intracellular levels and metabolically active mitochondria**

After culture, the oocytes were recovered and intracellular reduced glutathione (GSH) and mitochondrial activity were measured as previously described (Gouveia et al. 2016). Briefly, 4-chloromethyl-6.8-difluoro-7-hydroxycoumarin (CellTracker® Blue; CMF2HC; Invitrogen Corporation) and MitoTracker Red (MitoTracker® Red, CMXRos, Molecular Probes, Melbourne, Victoria, Australia) were used to detect intracellular GSH and mitochondrial activity levels as blue and red fluorescence, respectively. Oocytes were incubated in the dark for 30 min in PBS supplemented with 10 mM of CellTracker® Blue and 100 nM MitoTracker® Red at 39 °C. After incubation, the oocytes were washed with PBS and the fluorescence was observed under an epifluorescence microscope with UV filters (370 nm for GSH and 579-599

nm for active mitochondria). Fluorescence intensities of the oocytes were analyzed using Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

### **Maturation of ovine oocytes from *in vitro* cultured secondary follicles**

*In vitro* maturation (IVM) was performed in oocytes derived from *in vitro* grown follicles after 12 days of culture in  $\alpha$ -MEM+ (medium with antioxidants) or in the treatment that obtained the best results (medium containing 56.25  $\mu$ g/mL PCA). For this, additional pairs of ovine ovaries (n=10) were collected, washed and transported to the laboratory as described above. After 12 days of culture, all oocytes enclosed in healthy follicles were carefully collected with 26 G needles under a stereomicroscope. Only oocytes  $\geq 110$   $\mu$ m of diameter with a homogeneous cytoplasm and surrounded by at least 1 compact layer of cumulus cells were selected for IVM as previously described (Luz et al. 2012; Lunardi et al. 2016). The cumulus-oocyte complexes (COCs) were transferred to drops of 100  $\mu$ L of maturation medium composed of TCM 199 supplemented with 10% FCS, 1  $\mu$ g/mL FSH (human recombinant; Gonal-F; Serono Laboratórios, São Paulo, Brazil), and 1  $\mu$ g/mL LH (ovine pituitary) under oil, and incubated for 24 h under 5% CO<sub>2</sub> in air (Cecconi et al., 1999). The oocytes were incubated in drops of PBS containing 10 mM Hoechst 33342 for 15 min at room temperature in the dark and visualized under fluorescence microscopy. The chromatin configuration was analyzed through observation of the intact germinal vesicle (GV), meiotic resumption (including germinal vesicle breakdown [GVBD] or metaphase I [MI]) or nuclear maturation (metaphase II [MII]).

### **Detection of DNA fragmentation by TUNEL assay**

For evaluation of oocyte DNA fragmentation after IVM, ovine oocytes were subjected to the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) assay as previously described (Li et al. 2009). Briefly, healthy oocytes were fixed in 4% paraformaldehyde solution for 1 h at room temperature. Then, oocytes (14 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  $\mu$ L of permeabilizing solution [0.1% (v/v) Triton X-100 in 10 Mm PBS] for 3 h at room temperature. Positive and negative controls were incubated in drops of 100  $\mu$ 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  $\mu$ L terminal deoxynucleotidyl transferase (TDT) enzyme and 67.5  $\mu$ L of marker solution of 2-deoxyuridine triphosphate 5-FITC were made to obtain 75  $\mu$ L of TUNEL mixture for reaction. The experimental groups and the positive control were incubated with 15  $\mu$ L of this solution for 1 h at 37 °C in a moist chamber in the dark. The negative control was incubated at 15  $\mu$ L with the marker solution. Oocytes were washed 3 times in drops of PBS/PVP and incubated in drops of PBS containing 10 mM Hoechst 33342 for 15 min 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 x400. Oocytes were considered TUNEL-positive (with DNA fragmentation) when they have marked chromatin with green fluorescence.

### **Statistical analysis**

Data from follicle survival, extruded follicles, antrum formation, retrieval of fully grown oocytes, DNA fragmentation and meiotic resumption after *in vitro* culture were expressed as percentages and compared by the Chi-squared test. Data from follicular diameter and growth rate were submitted to the Agostinho-Pearson test (analog of the Shapiro-Wilk test) to verify normal distribution of residues and homogeneity of variances. Then, Kruskal-Wallis non-parametric test was used for comparisons. Data from GSH and mitochondrial activity were submitted to the Shapiro-Wilk test to verify normal distribution of residues and homogeneity of variances using the Univariate procedure. The residues had no normal distribution and then were transformed to ( $\log_{10}(x + 1)$ ). However, due to the heterogeneity of the variances, the Kruskal-Wallis non-parametric test was used to compare the treatments with the NPAR1WAY procedure. The analysis of variance was performed



by the Mixed procedure for presenting repeated measurements over time. The model included treatment effect (concentrations of PCA and presence of antioxidant), culture time and interaction effect. The results were expressed as the means  $\pm$  standard error mean (SEM), and differences were considered significant when  $P < 0.05$ . In all tests the software package SAS 9.0 was used.

## Results

### Morphology and follicular development after *in vitro* culture

The morphologically normal secondary follicles showed visible and central oocytes, normal granulosa cells and intact basement membrane (Fig. 2A). At day 6, antral (Fig. 2B), atretic (Fig. 2C) and extruded (Fig. 2D) follicles were observed. Moreover, from day 0 to day 6 of culture, there was a significant reduction in the percentage of morphologically normal follicles in all treatments (Fig. 3). After 12 days, the treatment containing 56.25  $\mu\text{g/mL}$  PCA (in antioxidant free medium) showed higher percentage of normal follicles (follicular survival: 81.5%) than medium without antioxidants ( $\alpha$ -MEM: 57.7%), medium with antioxidants ( $\alpha$ -MEM+: 69.4%) or medium containing the other concentrations of PCA ( $P < 0.05$ ), except for 900  $\mu\text{g/mL}$  PCA (72.2%) ( $P > 0.05$ ). All treatments showed antral cavity formation at day 6, maintaining the rates until day 12 ( $P > 0.05$ ; Fig. 4). At days 6 and 12 of culture, antrum formation was significantly higher in treatments containing 56.25; 112.5 or 900  $\mu\text{g/mL}$  PCA than control medium ( $\alpha$ -MEM; without antioxidant) and similar ( $P > 0.05$ ) to the other treatments. Regarding to extrusion, follicular diameter and daily growth rate, there was no difference ( $P > 0.05$ ) among treatments (data not show).

At the end of culture, the rates of fully grown oocytes ( $\geq 110 \mu\text{m}$ ) were similar ( $P > 0.05$ ) among all treatments containing PCA (average of 36.6%) and  $\alpha$ -MEM+ with antioxidants (35%), and those were significantly superior than control medium without antioxidants ( $\alpha$ -MEM: 19.23%), except for 450  $\mu\text{g/mL}$  PCA ( $P > 0.05$ ) (Fig. 5).

### **Intracellular levels of GSH and active mitochondria**

At day 12, the oocyte levels of GSH and mitochondrial activity were higher ( $P < 0.05$ ) in medium containing antioxidants ( $\alpha$ -MEM+) than in the control medium ( $\alpha$ -MEM) and similar ( $P > 0.05$ ) to all PCA treatments (Fig. 6). Moreover,  $\alpha$ -MEM+ and treatments containing 225; 450 or 900  $\mu\text{g/mL}$  PCA showed higher ( $P < 0.05$ ) GSH levels than the control medium. In addition,  $\alpha$ -MEM+ and medium with 450  $\mu\text{g/mL}$  PCA also improved mitochondrial activity compared to control medium ( $P < 0.05$ ).

### **Chromatin configuration and oocyte DNA fragmentation after IVM**

When evaluating chromatin configuration, some oocytes in GV (Fig. 7A) were observed, and the majority of oocytes were able to resume meiosis (GVBD: Fig. 7B, MI: Fig. 7C and MII: Fig. 7D). However, the percentage of meiotic resumption (GVBD or MI) in base medium containing antioxidants ( $\alpha$ -MEM+) or containing 56.25  $\mu\text{g/mL}$  PCA did not differ (Table 1). Notably, only follicle cultured in 56.25  $\mu\text{g/mL}$  PCA had one oocyte in MII. The TUNEL assay revealed the absence or very few oocytes with DNA fragmentation after IVM (Fig. 8A-B). All oocytes showed marking chromatin with Hoechst 33342 in blue fluorescence (Fig. 8C-D). No differences ( $P > 0.05$ ) on TUNEL positive oocytes were observed between treatments (Fig. 8E).

### **Discussion**

The present study was the first to evaluate the effect of different concentrations of PCA on the *in vitro* culture of ovarian follicles. The three antioxidants selenium, transferrin and ascorbic acid have been generally added to the *in vitro* culture of ovine isolated follicles at the same concentrations used in the current study, maintaining between 60-80% of follicular survival at day 12 of culture (Santos et al. 2014; Barberino et al. 2016). After culture of ovarian follicles, selenium or its active form (sodium selenite) reduced ROS concentration, increased the total antioxidant capacity and the levels of glutathione peroxidase (GSH-Px) (Abedelahi et al. 2010),

which is a selenium-dependent protein (Vega et al. 2016). Moreover, selenium preserves mitochondrial function and stimulates mitochondrial mitogenesis in neuronal cells after cerebral ischemia in mice (Mehta et al. 2012; Mendeleev et al. 2012). Besides cellular iron transport, transferrin is a chelating agent that removes toxic metals present in the culture medium (excess of metal ions, for example, zinc and iron) (Barnes and Sato 1980; Córdova et al. 2010). Transferrin was essential to the differentiation of swine granulosa cells of immature follicles (2-4 mm diameter) cultured *in vitro* (Durlej et al. 2008). Furthermore, ascorbic acid or vitamin C is a low molecular weight compound, which reduces ROS levels and increases the intracellular GSH in the cellular oxidative processes (Lutsenko et al. 2002; Kere et al. 2013). Ascorbic acid has also been reported to maintain the ultrastructure of liver mitochondrial cristae in rats treated with arsenic trioxide (Singh and Rana 2010). Therefore, these compounds isolated or in association possibly help support follicular metabolism.

Nevertheless, after 12 days of culture, addition of 56.25 µg/mL PCA as the sole antioxidant to the culture medium improves follicular survival compared to the medium supplemented with the three different antioxidants cited above (transferrin, selenium and ascorbic acid). Moreover, follicular and oocyte development, intracellular levels of GSH and mitochondrial activity were similar among α-MEM+ and all PCA concentrations. PCA maintains the viability of rat neural stem cells, reducing the number of apoptotic cells and ROS production, and increasing the activity of catalase enzyme, but without change GSH-Px activity and total GSH levels (Guan et al. 2006b; Guan et al. 2011). Furthermore, PCA attenuated oxidative stress damage in PC12 cells (adrenal gland; pheochromocytoma) and retinal ganglion cells of rats exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Shi et al. 2006; Wang et al. 2015). Other *in vitro* studies have demonstrated PCA effectiveness in chelating metal ions and scavenging ROS (Li et al. 2011), preventing lipid peroxidation caused by the interaction between these molecules and the biological membranes (Niki 2009; 2014), thus preserving cellular membrane integrity and permeability. In addition, PCA prevents mitochondrial membrane potential dysfunction in PC12 cells exposed or not to 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP<sup>+</sup>; neurotoxin) (An et al. 2006; Guan et al. 2006a). Therefore, we can suggest that PCA at 56.25 µg/mL was able to produce GSH and to maintain mitochondrial function and consequently to support follicular viability.

At the end of culture, treatments containing 56.25; 112.5 or 900 µg/mL PCA showed higher antrum formation than control medium (α-MEM; without antioxidant) and were similar to the other treatments. Moreover, all media containing antioxidants (combination of transferrin, selenium and ascorbic acid or only PCA) showed higher rates of fully grown oocytes than control medium, except for 450 µg/mL PCA. These findings highlight the importance of adding adequate concentrations of antioxidants agents to the culture medium, especially, for antrum formation, which is essential for follicular development (Rodgers and Rodgers 2010) and consequently to the achievement of oocytes ( $\geq 110 \mu\text{m}$ ) able to resume meiosis (Crozet et al. 2000). In fact, this study showed that the tested culture conditions (α-MEM+ and 56.25 µg/mL PCA) did not affect meiotic resumption. Notably, one oocyte from PCA treatment reached the MII stage. Other studies have shown that sheep oocytes from secondary follicles cultured *in vitro* for 18 days are able to resume meiosis after 36 to 40 hours of IVM (Luz et al. 2012; Lunardi et al. 2016). Therefore, in the current study, an extended culture and/or maturation period may be required for oocytes derived from *in vitro* grown preantral follicles to achieve *in vitro* maturation.

The low rates of DNA fragmentation found in the present study in both α-MEM+ and 56.25 µg/mL PCA treatments may also be explained by the presence of antioxidants in the medium. Ascorbic acid reduces the fragmentation of DNA after culture of rat isolated secondary follicles (Murray et al., 2001), selenium decreases the apoptosis of *in vitro* cultured porcine embryos (Uhm et al. 2007) and PCA reduces nuclear fragmentation and apoptosis after *in vitro* culture of neural stem cells and PC12 from rats (Guan et al. 2006a, b; Guan et al. 2009), maintaining the DNA integrity.

In conclusion, PCA at 56.25 µg/mL as the sole antioxidant added to the medium for ovine secondary follicle culture, replacing the association of transferrin, selenium and ascorbic acid, maintains follicular survival, GSH and active mitochondria levels, meiotic developmental competence and DNA integrity of cultured oocytes.

## **Acknowledgments**

V. G. Menezes holds a scholarship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil). M. H. T. Matos is supported by a grant from CNPq (310712/2015-7).

## References

- Abedelahi A., Salehnia A., Allameh A.A., Davoodi D. (2010). Sodium selenite improves the *in vitro* follicular development by reducing the reactive oxygen species level and increasing the total antioxidant capacity and glutathione peroxide activity. *Hum Reprod* **25**, 977-985.
- An L.J., Guan S., Shi G.F., Bao Y.M., Duan Y.L., Jiang B. (2006). Protocatechuic acid from *Alpinia oxyphylla* against MPP<sup>+</sup>-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Food Chem Toxicol* **44**, 436–443.
- Arunakumari G., Shanmugasundaram N., Rao V. H. (2010). Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. *Theriogenology* **74**, 884-94.
- Barberino R.S., Barros V.R.P., Menezes V.G., Santos L.P., Araújo V.R., Queiroz M.A.A., Almeida J.R.G.S, Palheta-Junior R.C., Matos M.H.T. (2016). *Amburana cearensis* leaf extract maintains survival and promotes *in vitro* development of ovine secondary follicles. *Zygote* **24**, 277-285.
- Barnes D., Sato G. (1980). Methods for growth of cultured cells in serum-free medium. *Anal Biochem* **102**, 255-270.
- Beytur A., Ciftci O., Aydin M., Cakir O., Timurkaan N., Yilmaz F. (2012). “Protocatechuic acid prevents reproductive damage caused by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in male rats.” *Andrologia* **44**, 454–461.
- Cecconi, S., Barboni, B., Coccia, M. and Mattioli, M., (1999). *In vitro* development of sheep preantral follicles. *Biol Reprod*, **60**, 594–601.
- Circu M., Aw T.Y. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems and apoptosis. *Free Radic Biol Med* **48**, 749–762.
- Córdova B., Morató R., Izquierdo D., Paramio T., Mogas T. (2010). Effect of the addition of insulin–transferrin– selenium and/or L-ascorbic acid to the *in vitro* maturation of prepubertal bovine oocytes on cytoplasmic maturation and embryo development. *Theriogenology* **74**, 1341–1348.
- Crozet N., Dahirel M., Gall L. (2000). Meiotic competence of *in vitro* grown goat oocytes. *J Reprod Fertil* **118**, 367–373.
- Durlej M., Duda M., Knapczyk K., Somczyńska M. (2008). Effects of transferrin on aromatase activity in porcine granulosa cells *in vitro*. *Folia Histochem Cytobiol* **46**, 423-428.

- Gouveia B.B., Barros V.R.P., Gonçalves R.J.S., Barberrino R.S., Menezes V.G., Lins T.L.B., Macedo T.J.S., Santos J.M.S., Rolim, L.A., Rolim P.J., Almeida J.R.G.S., Matos M.H.T. (2015). Effect of ovarian tissue transportation in *Amburana cearensis* extract on the morphology and apoptosis of goat preantral follicles. *Anim Reprod* **12**, 316-323.
- Gouveia B.B., Macedo T.J.S., Santos J.M.S., Barberino R.S., Menezes V.G., Müller M.C., Almeida J.R.G.S., Figueiredo J.R., Matos M.H.T. (2016). Supplemented base medium containing *Amburana cearensis* associated with FSH improves *in vitro* development of isolated goat preantral follicles. *Theriogenology* **86**, 1275-1284.
- Guan S., Bao Y.M., Jiang B., An L.J. (2006a). Protective effect of protocatechuic acid from *Alpinia oxyphylla* on hydrogen peroxide-induced oxidative PC12 cell death. *Eur J Pharmacol* **538**, 73–79.
- Guan S., Jiang B., Bao Y.M., An L.J. (2006b). Protocatechuic acid suppresses MPP<sup>+</sup>-induced mitochondrial dysfunction and apoptotic cell death in PC12 cells. *Food Chem Toxicol* **44**, 1659–1666.
- Guan S., Ge D., Liu T.Q., Ma X.H., Cui Z.F. (2009). Protocatechuic acid promotes cell proliferation and reduces basal apoptosis in cultured neural stem cells. *Toxicol In Vitro* **23**, 201–208.
- Guan, S., Zhang X.L., Ge D., Liu T.Q., Ma X.H., Cui Z.F. (2011). Protocatechuic acid promotes the neuronal differentiation and facilitates survival of phenotypes differentiated from cultured neural stem and progenitor cells. *Eur J Pharmacol* **670**, 471-478.
- Kakkar S., Bais S.A. (2014). Review on Protocatechuic Acid and Its Pharmacological Potential. *ISRN Pharmacol* **2014**, 1-9.
- Kere M., Siriboon C., Lo N.W., Nguyenv N.T., Ju J.G. (2013). Ascorbic Acid Improves the Developmental Competence of Porcine Oocytes After Parthenogenetic Activation and Somatic Cell Nuclear Transplantation. *J Reprod Dev* **59**, 78-84.
- Li H.J., Liu D.J., Cang M., Wang L.M., Jin M.Z., Ma Y.Z., Shorgan B. (2009). Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocytes. *Anim Reprod Sci* **114**, 89-98.
- Li X., Wang X., Chen D., Chen1 S. (2011). Antioxidant Activity and Mechanism of Protocatechuic Acid *in vitro*. *Function Food Heal Disease* **7**, 232-244.

- Lin W.L., Hsieh Y.J., Chou F.P., Wang C.J., Cheng M.T., Tseng T.H. (2003). Hibiscus protocatechuic acid inhibits lipopolysaccharide-induced rat hepatic damage. *Arch Toxicol* **77**, 42–47.
- Lunardi F.O., Aguiar F.L.N., Duarte A.B.G., Araújo V.R., Lima L.F, Sá N.A.R, Correia H.H.V., Domingues F.S.F, Campello C.C., Smitz J., Figueiredo J.R., Rodrigues A.P.R. (2016). Ovine secondary follicles vitrified out the ovarian tissue grow and develop in vitro better than those vitrified into the ovarian fragments. *Theriogenology* **85**, 1203–1210.
- Luo L., Wel Q., Liu L., Lin X., Lin C., Zheing L., Zhao J. (2015). Protocatechuic acid benefits proliferation and phenotypic maintenance of rabbit articular chondrocytes: An *in vitro* study. *Exp Ther Med* **9**, 1865-1870.
- Lutsenko E.A., Cárcamo J.M., Golde D.W. (2002). Vitamin C prevents DNA mutation induced by oxidative stress. *J Biol Chem* **277**, 16895-16899.
- Luz V.B., Araújo V.R., Duarte A.B.G., Celestino J.J.H., Silva T.F.P., Magalhães-Padilha D.M., Chaves R.N., Brito I.R., Almeida A.P., Campello C.C., Feltrin C., Bertolini M., Santos R.R., Figueiredo J.R. (2012). Eight-Cell Parthenotes Originated From In Vitro Grown Sheep Preantral Follicles. *Reprod Sci* **19**, 1219-225.
- Luz V.B, Araújo V.R., Duarte, A.B.G., Silva G.M., Chaves R.N., Brito I.R., Serafim M.K.B., Campello C.C., Feltrin C., Bertolini M., Almeida A.P., Santos R.R., Figueiredo J.R. (2013). Kit ligand and insulin-like growth factor I affect the in vitro development of ovine preantral follicles. *Small Rumin Res* **115**, 99-102.
- Mehta S., Kumari S., Mendeleev N., Li P.A. (2012). Selenium preserves mitochondrial function, stimulates mitochondrial biogenesis, and reduces infarct volume after focal cerebral ischemia. *BMC Neurosci* **13**, 1-12.
- Mendeleev N., Mehta S.L., Idris H., Kumari S., Li P.A. (2012). Selenite Stimulates Mitochondrial Biogenesis Signaling and Enhances Mitochondrial Functional Performance in Murine Hippocampal Neuronal Cells. *Plos one* **7**, 1-7.
- Murray A.A., Molinek M.D., Baker S.J., Kojima F.N., Smith M.F., Hillier S.G., Spears N. (2001). Role of ascorbic acid in promoting follicle integrity and survival in intact mouse ovarian follicles in vitro. *Reproduction* **121**, 89–96.
- Niki E. (2009). Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radic Biol Med* **47**, 469–484.
- Niki E. (2014). Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. *Biochim Biophys Acta* **1840**, 809–817.

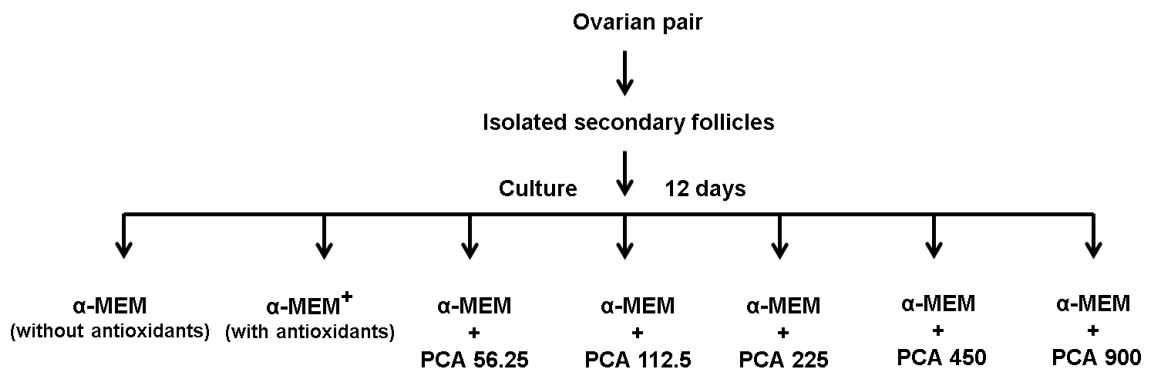
- Rodgers R.J., Rodgers F.I. (2010). Formation of the Ovarian Follicular Antrum and Follicular Fluid. *Biol Reprod* **82**, 1021–1029.
- Sá N.A.R., Araújo V.R., Correia H.H.V., Ferreira A.C.A., Guerreiro D.D., Sampaio A.M., Escobar E., Santos F.W., Moura A.A., Lôbo C.H., Ceccatto V.M., Campello C.C., Rodrigues A.P.R., Leal-Cardoso J.H., Figueiredo J.R. (2015). Anethole improves the *in vitro* development of isolated caprine secondary follicles. *Theriogenology* doi:0.1016/j.theriogenology.2015.12.014.
- Santos L.P., Barros V.R.P., Cavalcante A.Y.P., Menezes V.G., Macedo T.J.S., Santos J.M.S., Araujo V.R., Queiroz M.A.A., Matos M.H.T. (2014). Protein localization of epidermal growth factor in sheep ovaries and improvement of follicle survival and antrum formation *in vitro*. *Reprod Domestic Anim* **49**, 783-789.
- Shi G.F., An L.J., Jiang B., Guan S., Bao Y.M. (2006). *Alpinia* protocatechuic acid protects against oxidative damage in vitro and reduces oxidative stress in vivo. *Neurosci Lett* **403**, 206–210.
- Silva A.M.S., Bruno J.B., Lima L.F., Sá N.A.R., Lunardi F.O., Ferreira A.C., Correia H.H.V., Aguiar F.L., Araújo V.R., Lobo C.H., Moura A.A.A., Campello C.C., Smitz J., Figueiredo J.R., Rodrigues A.P.R. (2016). Connexin 37 and 43 gene and protein expression and developmental competence of isolated ovine secondary follicles cultured in vitro after vitrification of ovarian tissue. *Theriogenology* **85**, 1457-67.
- Singh S., Rana S.V.S. (2010). Ascorbic acid improves mitochondrial function in liver of arsenic-treated rat. *Toxicol Ind Health* **26**, 265-272.
- Succu S., Pasciu V., Manca M.E., Chelucci S., Torres-Rovira L., Leoni G.G., Zinellu A., Carru C., Naitana S., Berlinguer F. (2014). Dose-dependent effect of melatonin on postwarming development of vitrified ovine embryos. *Theriogenology* **81**, 1058–1066.
- Talebi A., Zavareh S., Kashani M.H., Lashgarbluki T., Karimi I. (2012). The effect of alpha lipoic acid on the developmental competence of mouse isolated preantral follicles. *J Assist Reprod Genet* **29**, 175–183.
- Uhm S.J., Gupta M.K., Yang J.H., Lee S.H., Lee H.T. (2007). Embryo development: Selenium improves the developmental ability and reduces the apoptosis in porcine parthenotes. *Mol Reprod Dev* **74**, 1386-1394.



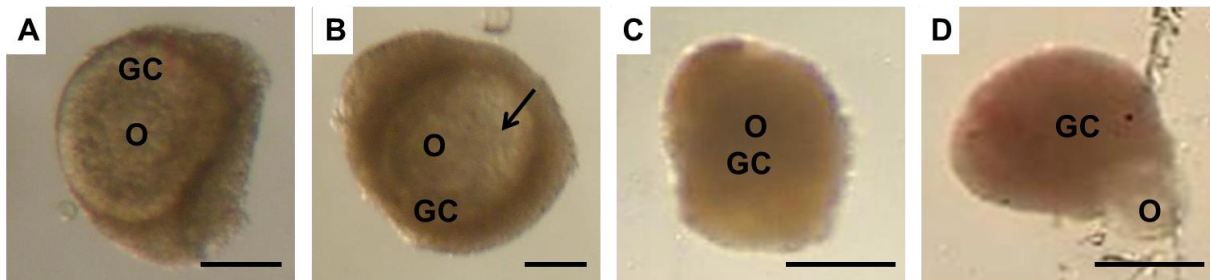
Vega R.G., Fernández-Sánchez M.L., Fernández J.C., Menéndez F.V.A., Sanz-Medel A. (2016). Selenium levels and Glutathione peroxidase activity in the plasma of patients with type II diabetes mellitus. *J Trace Elem Med Biol* **37**, 44–49.

Wang Z., Pan X., Wang D., Sun H., Han F., Lv C., Zhang X . (2015). Protective effects of protocatechuic acid on retinal ganglion cells from oxidative damage induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Neurol Res* **37**, 159-166.

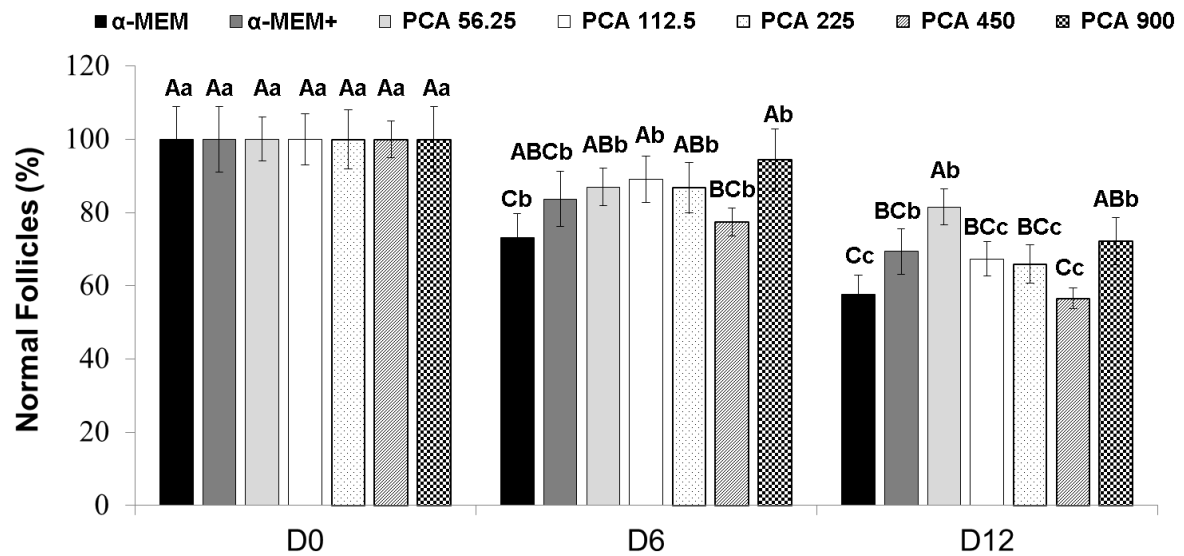
## Figure captions



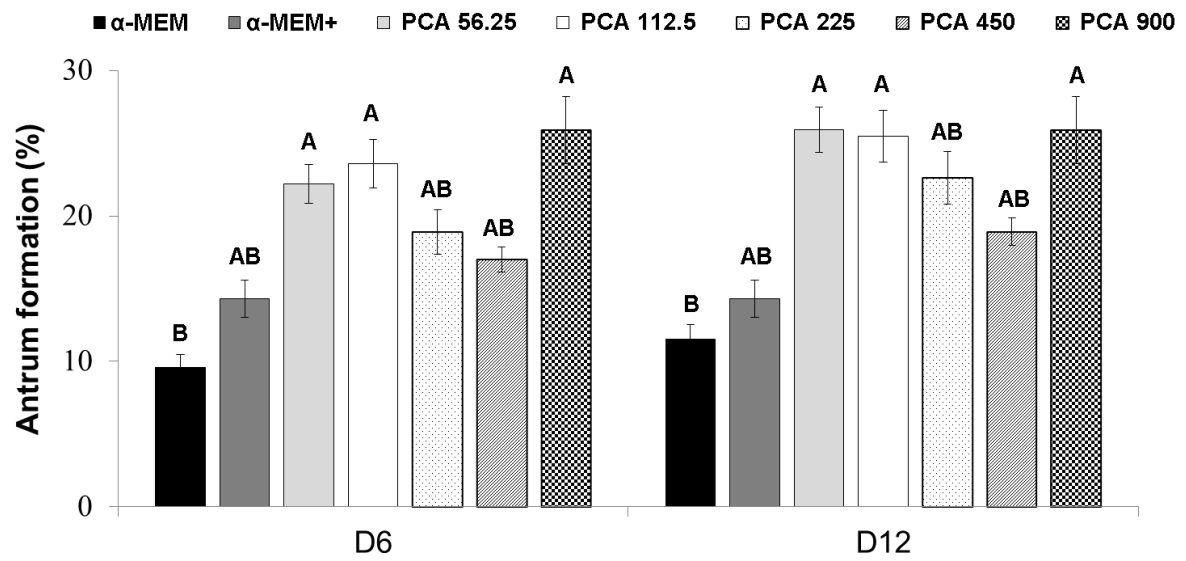
**Figure 1.** General experimental protocol for *in vitro* culture of sheep secondary follicles in medium without ( $\alpha$ -MEM) or with antioxidant ( $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>) or containing protocathechuic acid (PCA; concentration in  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Antioxidants: transferrin, selenium and ascorbic acid.



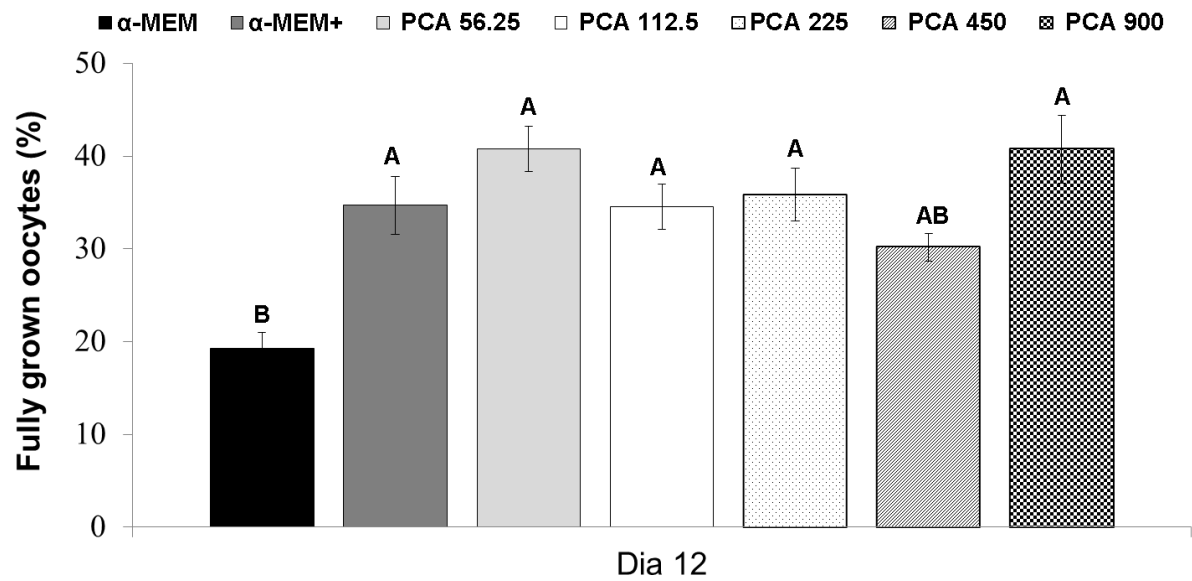
**Figure 2.** Morphologically normal secondary follicle at day 0 (A); antral follicle after 6 days of culture in 56.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PCA (B); atretic (C) and extruded (D) follicles after 6 days of culture in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>. GC: granulosa cells; O: oocyte. Arrow: antral cavity. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ .  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>: medium with antioxidants (transferrin, selenium and ascorbic acid); PCA: protocathechuic acid.



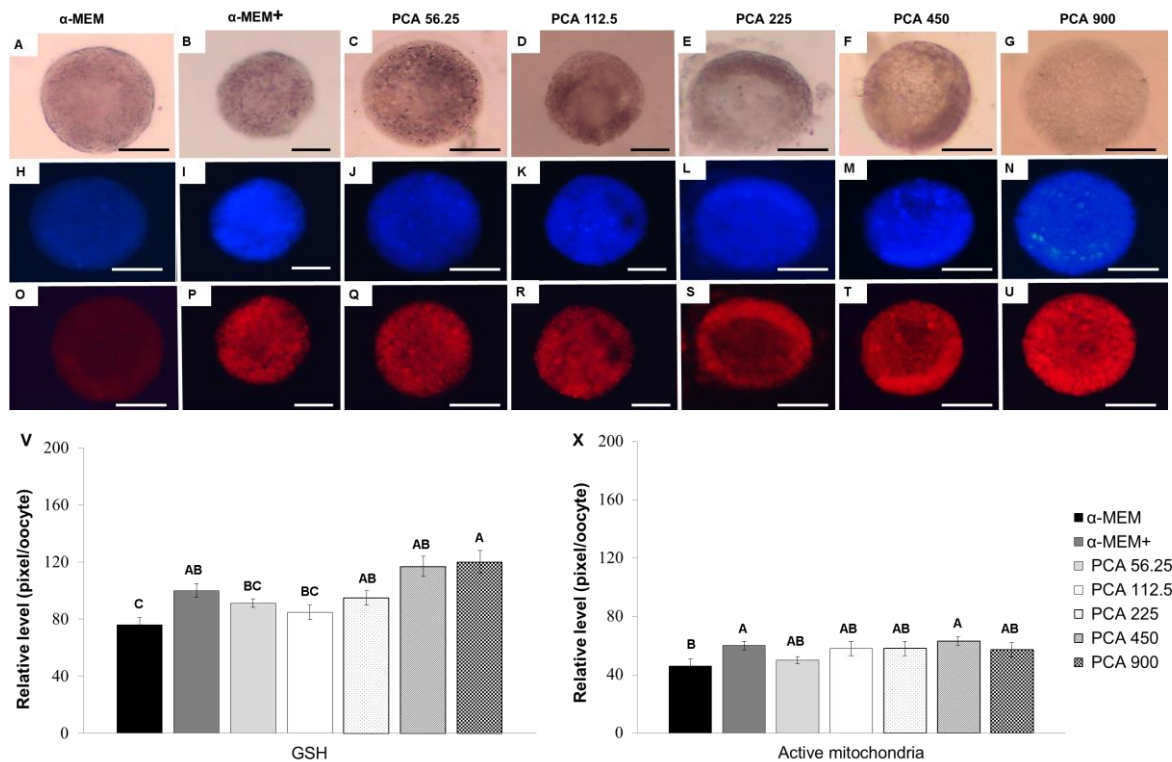
**Figure 3.** Percentages of morphologically normal follicles cultured in  $\alpha$ -MEM without ( $\alpha$ -MEM), or with antioxidants ( $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>) or with different concentrations of protocatechuic acid (56.25; 112.5; 225; 450 or 900  $\mu$ g/mL). (<sup>A, B, C</sup>) Different letters denote significant differences among treatments in the same period (P < 0.05). (<sup>a, b, c</sup>) Different letters denote significant differences among culture periods in the same treatment (P < 0.05).



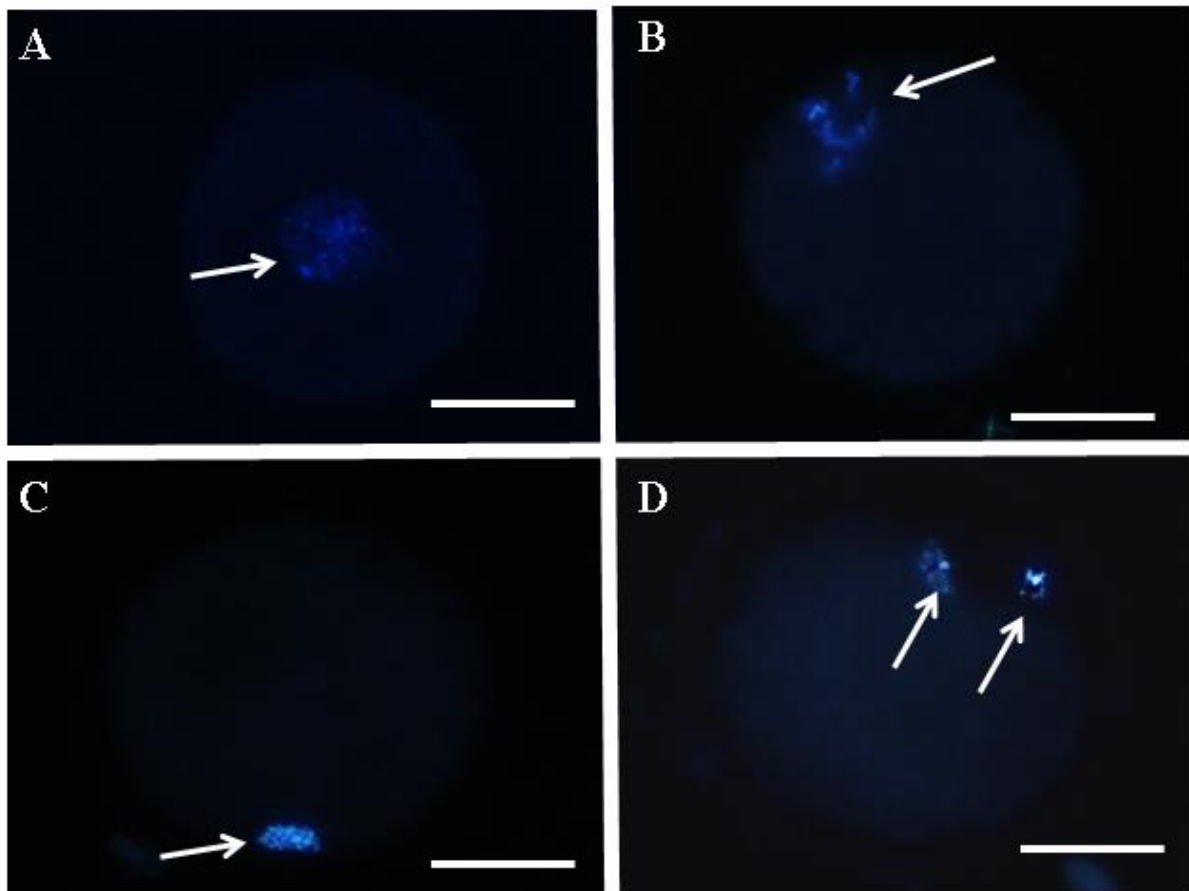
**Figure 4.** Percentages of antrum formation in follicles cultured in  $\alpha$ -MEM without ( $\alpha$ -MEM), or with antioxidants ( $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>) or with different concentrations of protocatechuic acid (56.25; 112.5; 225; 450 or 900  $\mu$ g/mL). (A, B, C) Different letters denote significant differences among treatments in the same period ( $P < 0.05$ ). PCA: protocatechuic acid.



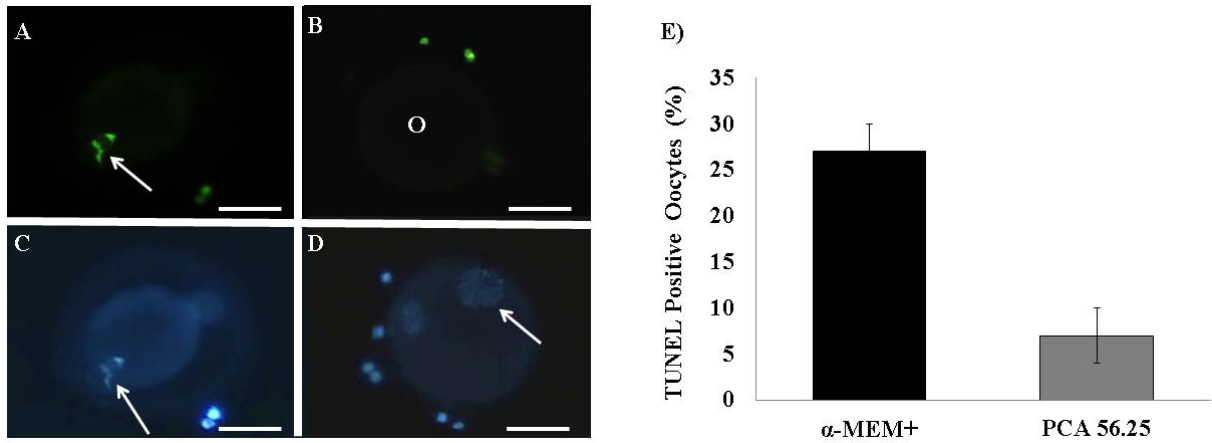
**Figure 5.** Percentages of fully grown oocytes after culture of secondary follicles in  $\alpha$ -MEM without ( $\alpha$ -MEM), or with antioxidants ( $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>) or with different concentrations of protocatechuic acid (56.25; 112.5; 225; 450 or 900  $\mu$ g/mL). (<sup>A, B, C</sup>) Different letters denote significant differences among treatments in the same period ( $P < 0.05$ ). (<sup>a, b, c</sup>) Different letters denote significant differences among culture periods in the same treatment ( $P < 0.05$ ). PCA: protocatechuic acid.



**Figure 6.** Epifluorescent photomicrographic images of ovine oocytes. Oocyte under bright field (A-G) were stained with CellTracker Blue (H-N) and MitoTracker Red (O-U) to detect intracellular levels of GSH and active mitochondria, respectively. Scale bars: 50  $\mu\text{m}$  (100x). Intracellular GSH (V) and active mitochondria (X) relative levels (pixel/oocyte) in sheep oocytes after 12 days of *in vitro* culture in medium without ( $\alpha$ -MEM) or with antioxidant ( $\alpha$ -MEM+) or containing protocatechuic acid (PCA; concentration in  $\mu\text{g/mL}$ ). (<sup>A, B</sup>) Bars with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).



**Figure 7.** Epifluorescent photomicrographic images of ovine oocytes stained with Hoechst 33342 after IVM. Oocytes in GV (A) and GVBD (B) cultured in medium with antioxidant ( $\alpha$ -MEM+); oocytes in MI (C) and MII (D) cultured in medium containing 56.25  $\mu$ g/mL protocatechuic acid. O: oocyte; Arrow: nuclear chromatin. Scale bars: 50  $\mu$ m.



**Figure 8.** DNA fragmentation of sheep oocytes after IVM. Oocyte with DNA fragmentation after culture in medium with antioxidant ( $\alpha$ -MEM+) (A and C) and normal oocyte cultured in medium containing 56.25  $\mu$ g/mL protocatechuic acid (B and D). O: oocyte; Arrow: nuclear chromatin. Scale bars: 50  $\mu$ m. Oocytes stained with TUNEL (A and B) and Hoechst 33342 (C and D). Percentages of TUNEL positive oocytes (E).



**Table 1.** Meiotic stages (%) of sheep oocytes from *in vitro* grown secondary follicles after 12 days of culture in  $\alpha$ -MEM+ or 56.25  $\mu$ g/mL PCA.

Treatments	% GV (n)	% GVBD (n)	% MI (n)	% MII (n)
$\alpha$ -MEM+	14.3 (02/14)	64.3 (09/14)	21.4 (03/14)	0.0 (00/14)
PCA 56.25	14.3 (02/14)	57.15 (08/14)	21.4 (03/14)	7.15 (01/14)

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, a adição de ácido protocatecuico, na concentração de 56,25 µg/mL, como único antioxidante adicionado ao meio de cultivo, manteve a sobrevivência e promoveu o desenvolvimento *in vitro* de folículos secundários ovinos isolados após 12 dias de cultivo. Devido a estes resultados e à praticidade, sugerimos a utilização do PCA como único antioxidante a ser adicionado ao meio de cultivo. Além disso, novos estudos poderão ser realizados com o PCA para verificar a sua ação antioxidante em meio contendo hormônios (FSH) e/ou fatores de crescimento.

## 8. REFERÊNCIAS

ABCAM PRODUCT DATASHEET. Protocatechuic acid ab142937, p. 1-6, 2015.

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

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 peroxide activity. **Human Reproduction**, v. 25, p. 977-985, 2010.

ABIR, R. et al. In vitro maturation of human primordial ovarian follicles: Clinical significance, progress in mammals, and methods for growth evaluation. **Histology Histopathology**, v. 21, p. 887-898, 2006.

ADHIKARI, D; LIU, K. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. **Endocrine Reviews**, v. 30, p. 438–464, 2009.

AERTS, J. M. J., BOLS, P. E. J. Ovarian Follicular Dynamics. A review with Emphasis on the Bovine Species. Part II: Antral Development, Exogenous Influence and Future Prospects. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 180–187, 2010.

AGARWAL, A.; SALEH, R. A.; BEDAIWY, M. A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**, v.79, p. 829–43, 2003.

ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325–354, 2007.

AN, L. J. Protocatechuic acid from *Alpinia oxyphylla* against MPP<sup>+</sup>-induced neurotoxicity in PC12 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 436–443, 2006.

ANAZETTI, M.C.; MELO, P.S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, v.1, p.37-58, 2007.

ANDRADE, E. R. et al. Effects of ascorbic acid on in vitro culture of bovine preantral follicles. **Zygote**, v. 20, p. 379–388, 2012.

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

ARUNAKUMARI, G.; SHANMUGASUNDARAM, N.; RAO, V. H. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. **Theriogenology**, v. 74, p. 884-94, 2010.

BACHHAWAT, A. K. et al. Glutathione transporters. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3154–3164, 2013.

BAILLET, A.; MANDON-PEPIN, B. Mammalian ovary differentiation - A focus on female meiosis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 356, p.13-23, 2012.

BARBERINO, R. S. et al. Amburana cearensis leaf extract maintains survival and promotes in vitro development of ovine secondary follicles. **Zygote**, p. 1-9, 2016.

BARNES, D.; SATO, G. Methods for growth of cultured cells in serum-free medium. **Analytical Biochemistry**, v.102, p.255-270, 1980.

BARRETT, C. W.; SHORT, S. P.; WILLIAMS, C. S. Selenoproteins and oxidative stress-induced inflammatory tumorigenesis in the gut. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2016. DOI 10.1007/s00018-016-2339-2

BERRA, C. M; MECK, C. F. M. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do Ciclo celular. **Química Nova**, v. 29, p.1340-1344, 2006.

BERTOLDO, M. J. Effects of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) supplementation during culture of the sheep ovarian cortex. **Animal Reproduction Science**, v. 149, p.124-34, 2014.

BERTOLDO, M. J. et al. Inhibitors of c-Jun phosphorylation impede ovine primordial follicle activation. **Molecular Human Reproduction**, v. 22, p. 338-349, 2016.

BEYTUR, A. et al. "Protocatechuic acid prevents reproductive damage caused by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in male rats." **Andrologia**, vol. 44, n. 1, p. 454–461, 2012.

BHATTACHARYYA, A. et al. Oxidative Stress: An Essential Factor in the Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Diseases. **Physiological Reviews**, v. 94, 329-354, 2014.

BINELLI, M.; MURPHY, B. D. Coordinated regulation of follicle development by germ and somatic cells. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, p.1–12, 2010.

BIRBEN, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organization**, v. 5, p. 9-19, 2012.

BONNET, A. An overview of gene expression dynamics during early ovarian folliculogenesis: specificity of follicular compartments and bi-directional dialog. **BMC Genomics**, v.14, p. 1-16, 2013.

BOTTONE, M. G. Morphological Features of Organelles during Apoptosis: An Overview. **Cells**, v. 2, p. 294-305, 2013.

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

CAMPBELL, B. K. The endocrine and local control of ovarian follicle development in the ewe. **Animal Reproduction**, v.6, p.159-171, 2009.

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*. **Reproductive Sciences**, v. 16, p. 239-246, 2009.

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.:578-82, 2016.

CHAN, K. et al. Protective effects of Danshensu from the aqueous extract of *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) against homocysteine- induced endothelial dysfunction. **Life Sciences**, v. 75, p. 3157-3171, 2004.

CIFTCI, H. B. Regulation of Follicular Growth and Development in Sheep. **Iranian Journal of Applied Animal Science** v, 4, 21-31, 2014.

CIRCU, M.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems and apoptosis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 48, p.749–762, 2010.

CÓRDOVA, B. et al. Effect of the addition of insulin–transferrin– selenium and/or L-ascorbic acid to the in vitro maturation of prepubertal bovine oocytes on cytoplasmic maturation and embryo development. **Theriogenology**, v. 74, p.1341–1348, 2010.

CUI, H.; KONG, Y.; ZHANG, H. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. **Journal of signal transduction**, 2012. DOI: 10.1155/2012/646354.

DENG, J-S. et al. Anti-apoptotic and pro-survival effect of protocatechuic acid on hypertensive hearts. **Chem-Biological Interactions**, v. 209, p. 77–84, 2014.

DESAGHER, S.; MARTINOU, J. C. Mitochondrial as the central control point of apoptosis. **Trends in Cell Biology**, v.10, p. 369-76, 2000.

DEVINE, P.J.; PERREAULT, S.D.; LUDERER, U. Roles of Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Ovarian Toxicity. **Biology of Reproduction**, v. 86, p.1–10, 2012.

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

DRUMMOND, A. E. The role of steroids in follicular growth. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4, p.1-11, 2006.

DURLEJ, M. G. et al. Effects of transferrin on aromatase activity in porcine granulosa cells in vitro. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 46, p. 423-428, 2008.

EDSON, M. A.; NAGARAJA, A. K.; MATZUK, M. M. The mammalian ovary from genesis to revelation. **Endocrine Reviews**, v. 30, p.624-712, 2009.

ESMAIELZADEH, F. Kit ligand and glial-derived neurotrophic factor as alternative supplements for activation and development of ovine preantral follicles in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 80, p.35-47, 2013.

FAUSTINO, L. R. Criopreservação de t ação de tecido ovariano: limitações e perspectivas para a preservação da fertilidade de fêmeas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, p.1-15, 2011.

FIERS, W. et al. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. **Oncogene**, v.18, p.7719-7730, 1999.

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.

FORTUNE, J. E. et al. Triennial Reproduction Symposium: The ovarian follicular reserve in cattle: What regulates its formation and size? **Journal of Animal Science**, p. 91, p.3041-3050, 2013.

FRANSOLET, M. et al. Strategies for Using the Sheep Ovarian Cortex as a Model in Reproductive Medicine. **Plos one**, v. 9, p. 1-7, 2014.

GALLOWAY, S.M. et al. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. **Nature Genetics**, v. 25, 279–283, 2000.

GOGVADZE, V.; ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B. Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1757, p.639-647, 2006.

GOMES, R. G. et al. Improvement of development of equine preantral follicles after 6 days of in vitro culture with ascorbic acid supplementation. **Theriogenology**, v. 84, p.750-755, 2015.

GONG, S. P.; LIM, J. M. Effects of  $\beta$ -Mercaptoethanol on the Growth of Preantral Follicles and the Maturation of Intrafollicular Oocytes. Asian-Aust. **Journal of Animal Science**, v. 22, p. 35 – 41, 2009.

GOSDEN, R. G. et al. R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196°C. **Human Reproduction**, v. 9, p. 597-603, 1994.

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. Effect of ovarian tissue transportation in *Amburana cearensis* extract on the morphology and apoptosis of goat preantral follicles. **Animal Reproduction**, v.12, p. 316-323, 2015.

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.

GUAN, S. et al. Protective effect of protocatechuic acid from *Alpinia oxyphylla* on hydrogen peroxide-induced oxidative PC12 cell death. **European Journal of Pharmacology**, v. 538, p. 73–79, 2006a.

GUAN, S. et al. Protocatechuic acid suppresses MPP<sup>+</sup>-induced mitochondrial dysfunction and apoptotic cell death in PC12 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 1659–1666, 2006b.

GUAN, S. et al. Protocatechuic acid promotes cell proliferation and reduces basal apoptosis in cultured neural stem cells. **Toxicology In Vitro**, v. 23, p.201–208, 2009.

GUAN, S. et al. Protocatechuic acid promotes the neuronal differentiation and facilitates survival of phenotypes differentiated from cultured neural stem and progenitor cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 670, p. 471-478, 2011.

GUMUS, B.; KILIC, S.; ZULFIKAROGLU, E. Role of apoptosis-related factors in follicular atresia. **International Journal of Genetics and Molecular Biology**, v.5, p. 54-63, 2013.

GUPTA, S. et al. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Assisted Reproduction. **Current Women's Health Reviews**, v. 6, 227-238, 2010.

HAPPO, L.; STRASSER, A.; CORY, S. BH3-only proteins in apoptosis at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 125, p. 1081–1087, 2012.

HATZIPANAYIOTI, D. et al. Theoretical and Spectroscopic Investigation of the Oxidation and Degradation of Protocatechuic Acid. **Chemical Physics**, v.325, p. 341-350, 2006.



- HENNET, M. L.; COMBELLES, C. M. H. The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. **The International Journal of Developmental Biology**, v.,56, p. 819-831, 2012.
- HONGMEI, Z. Extrinsic and Intrinsic apoptosis Signal Pathway Review. **INTECH**, P. 1-20, 2012.
- HUSSEIN, M. R. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. **Human Reproduction Update**, v. 11, p. 162-178, 2005.
- IMHOF, M et al. Orthotopic microvascular reanastomosis of whole cryopreserved ovine ovaries resulting in pregnancy and live birth. **Fertility and Sterility**, v. 85, p. 1208-1215, 2006.
- JANA, S. K. et al. Redox-active nanoceria depolarize mitochondrial membrane of human colon cancer cells. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 16, p. 1-9, 2014.
- JUENGEL, J. L. et al. Origins of follicular cells and ontogeny of steroidogenesis in ovine fetal ovaries. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 31, p. 1-10, 2002.
- KAKKAR, S.; BAIS, S. A Review on Protocatechuic Acid and Its Pharmacological Potential. **ISRN Pharmacol**, v. 2014, p. 1-9, 2014.
- KAMALAMMA, P. et al. Effect of leptin on in vitro development of ovine preantral ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 85, p. 224-9, 2016
- KASHKA, R.H., ZAVAREH S., LASHKARBOLUKI T. The role of Coenzyme Q10 on the Total Antioxidant Capacity of Mouse Vitrified Pre-Antral Follicles. **Journal of Paramedical Sciences**. v. 6, p. 1-9, 2015.
- KERE, M. et al. Ascorbic Acid Improves the Developmental Competence of Porcine Oocytes After Parthenogenetic Activation and Somatic Cell Nuclear Transplantation. **Journal of Reproduction and Development**, v. 59, p.78-84, 2013.
- KERR, J. B. et al. The primordial follicle reserves not renewed after chemical or g-irradiation mediated depletion. **Reproduction**, v. 14, 3469-3476, 2012.

LEAL, L.K.A.M. et al. A comparative chemical and pharmacological study of standardized extracts and vanillic acid from wild and cultivated *Amburana cearensis* A.C. Smith., **Phytomedicine**, v. 18, p. 230-233, 2010.

LEDDA, S. Characterization, isolation and culture of primordial germ cells in domestic animals: recent progress and insights from the ovine species. **Theriogenology**, v. 74, p. 534–543, 2010.

LI, X. et al. Antioxidant Activity and Mechanism of Protocatechuic Acid in vitro. **Functional Foods in Health and Disease**, v. 7, p.232-244, 2011.

LIN, W. L. et al. Hibiscus protocatechuic acid inhibits lipopolysaccharide-induced rat hepatic damage. **Archives of Toxicology**, v. 77, p 42–47, 2003.

LIU, G. T. et al. Protective action of seven natural phenolic compounds against peroxidative damage to biomembranes. **Biochemical Pharmacology**, 43, 147–152, 1992.

LIU, Y. M. et al. Protocatechuic acid inhibits apoptosis by mitochondrial dysfunction in rotenone-induced PC12 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 430– 437, 2008.

LORNAGE, J. et al. Vitrification du tissu ovarien: cortex et ovaire entier chez la brebis. **Gynécologie Obstétrique & Fertilité**, v. 34, p. 746-753, 2006.

LUCENA, D. S. et al. Plantas medicinais utilizadas na comunidade urbana de Lagoa, Sertão Paraibano, **Rev Biol Farm**, v. 9, n. 1, p. 105-115, 2013.

LUDERER, U. Chapter Four – Ovarian Toxicity from Reactive Oxygen Species. **Vitamins & Hormones**, v. 94, p. 99-127, 2014.

LUNARDI, F. O. et al. Vitrified sheep isolated secondary follicles are able to grow and form antrum after a short period of in vitro culture. **Cell and Tissue Research**, v. 362, p. 241-251, 2015.

LUO, L. et al. Protocatechuic acid benefits proliferation and phenotypic maintenance of rabbit articular chondrocytes: An *in vitro* study. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 9, p. 1865-1870, 2015.

LUTSENKO, E. A.; CÁRCAMO, J. M.; GOLDE, D. W. Vitamin C prevents DNA mutation induced by oxidative stress. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 16895-16899, 2002.

LUZ, V. B. et al. Eight-Cell Parthenotes Originated From In Vitro Grown Sheep Preantral Follicles. **Reproductive Sciences**, v. 19, p.1219-225, 2012.

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

MAGALHÃES, D. M. et al. Papel do Hormônio Folículo Estimulante na foliculogênese in vivo e in vitro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, p.171-182, 2009.

MARCHINI, S. et al. Mitochondria-Ros Crosstalk in the Control of Cell Death and Aging. **Journal of Signal Transduction**, v. 2012, p. 1-17, 2012.

MARTINS, F.S.; VIANA, J.R.S.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, p. 36-49, 2008.

MAY-PANLOUP, P. et al. Ovarian ageing: the role of mitochondria in oocytes and follicles. **Human Reproduction Update**, p. 1–19, 2016.doi:10.1093/humupd/dmw028

MCNATTY, K. P. et al. Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 163, 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. **Biology of Reproduction**, v. 94 (4), p. 1-11, 2016.

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

MONIRUZZAMAN, M.; MIYANO, T. Growth of primordial oocytes in neonatal and adult mammals. **Journal of Reproduction and Development**, v. 56, p. 559-566, 2010.

MOORE, R.K.; SHIMASAKI, S. Molecular biology and physiological role of the oocyte factor, BMP-15. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 234, p. 67-73, 2005.

NIKI, N. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, p. 469–484, 2009.

NIKI, N. Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1840, p. 809–817, 2014.

PARTE, S. et al. Detection, characterization, and spontaneous differentiation *in vitro* of very small embryonic-like putative stem cells in adult mammalian ovary. **Stem Cells and Development**, v. 20, p. 1451–1464, 2011.

PAULINI, F. et al. Ultrastructural changes in oocytes during folliculogenesis in domestic mammals. **Journal of Ovarian Research**, v.7, p.1-12, 2014.

PENG, X. et al. In vitro culture of sheep lamb ovarian cortical tissue in a sequential culture medium. **J Assist Reprod Genet**, v. 27, p. 247–57, 2010.

PEI, K. et al. *p*-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, p.2952-2962, 2016.

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

REN, J. et al; Mitochondrial biogenesis in the metabolic syndrome and cardiovascular disease. **Journal of Molecular Medicine**, v.88, p.993-1001, 2010.

RICHARDS, J. S.; PANGAS, S. A. The ovary: basic biology and clinical implications. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, p. 963-972, 2016.

ROQUE, A. A.; ROCHA, R. M.; LOIOLA, M. I. B. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil), **Rev Bras Plantas Med**, v.12, n.1, p.31-42, 2010.

SÁ, N. A. R. et al. Anethole improves the *in vitro* development of isolated caprine secondary follicles. **Theriogenology**, 2015, doi:0.1016/j.theriogenology.2015.12.014.

SADEGHNIA, S. et al. Development of sheep primordial follicles encapsulated in alginate or in ovarian tissue in fresh and vitrified samples. **Cryobiology**, v. 72, p.100-105, 2016.

SALES, A. D. et al., Steady-state level of messenger RNA and immunolocalization of aquaporins 3, 7, and 9 during in vitro growth of ovine preantral follicles. **Theriogenology**, v. 84, p. 1–10, 2015.

SALLE, B. et al. Normal pregnancies and live births after autograft of frozen-thawed hemiovaries into ewes. **Fertility and Sterility**, v. 77, p.403-408, 2002.

SALLE, B. et al. Long-term follow-up of cryopreserved hemi-ovary autografts in ewes: pregnancies, births and histologic assessment. **Fertility and Sterility**, v. 80, p. 172-177, 2003.

SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1822, p.1896–1912, 2012.

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

SANTOS, L. P. et al. Protein localization of epidermal growth factor in sheep ovaries and improvement of follicle survival and antrum formation in vitro. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 49, p. 783-9, 2014b.

SAUVAT, F. et al. Ovarian function is restored after grafting of cryopreserved immature ovary in ewes. **FASEB Journal: Official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 27, p. 1511–1518, 2013.

SEMAMING, Y. et al. Pharmacological Properties of Protocatechuic Acid and Its Potential Roles as Complementary Medicine. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-11, 2015.

SHI, G. F. et al. *Alpinia* protocatechuic acid protects against oxidative damage in vitro and reduces oxidative stress in vivo. **Neuroscience Letters**, v. 403, p.206–210, 2006.

SHIN, H. A. et al. Radioprotective effect of epicatechin in cultured human fibroblasts and zebrafish. **Journal of Radiation Research**, v. 55, p. 32–40, 2014.

SINGH, S. RANA, S. V. S. Ascorbic acid improves mitochondrial function in liver of arsenic-treated rat. **Toxicology and Industrial Health**, v. 26, p. 265-272, 2010.

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

SILVA, G. M. Ascorbic acid improves the survival and *in vitro* growth of isolated caprine preantral follicles. **Animal Reproduction**, v.8, p.14-24, 2011.

SOTO-SUAZO, M.; ZORN, T. M. Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects. **Animal Reproduction**, v.2, p.147-160, 2005.

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

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

SUCHAL, K. et al. Kampeferol protects against oxidative stress and apoptotic damage in experimental model of isoproterenol-induced cardiac toxicity in rats. **Phytomedicine**, v. 23, p.1401-1408, 2016.

SUKHOTNIK, I; ROFE, A. Germ Cell Apoptosis: Clinical Implications. **Andrology**, v. 3, p. 1-6, 2014.

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

TANG, X. et al. Protective Effect of Kaempferol on LPS plus ATP-Induced Inflammatory Response in Cardiac Fibroblasts-1. **Inflammation**, v. 38, p. 94-101, 2015.

TELFER, E. E.; ZELINSK, M. B. Ovarian follicle culture: advances and challenges for human and nonhuman primates. **Fertility and Sterility**, v. 99, p. 1523-1533, 2013.

THAKARE, V. N.; DHAKANE, V. D.; PATEL, B. M. Attenuation of acute restraint stress-induced depressive like behavior and hippocampal alterations with protocatechuic acid treatment in mice. **Metabolic Brain Disease**, p. 1-13, 2016. DOI:10.1007/s11011-016-9922-y.

THOMPSON, J. A.; FRANKLIN, C. C. Enhanced glutathione biosynthetic capacity promotes resistance to AS3+-induced apoptosis. **Toxicology Letters**, v. 193, p. 287-297, 2010.

TOWNSON, D. H.; COMBELLES, C. M. H. **Ovarian follicular atresia**. In: Darwish A (ed.), *Basic Gynecology – Some Related Issues*. In Tech, p. 156, 2012. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/basic-gynecologysome-related-issues/ovarian-follicularatresia>.

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.

WANG, W. et al. A modified protocol for *in vitro* maturation of mouse oocytes from secondary preantral follicles. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 3, p. 57-74, 2012.

WANG, Z. et al. Protective effects of protocatechuic acid on retinal ganglion cells from oxidative damage induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Neurological Research**, v. 37, p. 159-166, 2015.

WILDING, M. et al. Mitochondrial aggregation patterns and activity human oocytes and preimplantation embryos. **Human Reproduction**, v.16, p.909-917, 2001.

WILHELM, D.; PALMER, S.; KOOPMAN, P. Sex Determination and Gonadal Development in Mammals. **Physiological Reviews**, v. 87, p. 1–28, 2007.

YAN, S. et al. Age-associated up-regulation of EGR1 promotes granulosa cell apoptosis during follicle atresia in mice through the NF- $\kappa$ B pathway. **Cell Cycle**, v. 15, p.2895-2905, 2016.

YIN, M-C. et al. Apoptotic Effects of Protocatechuic Acid in Human Breast,

Lung, Liver, Cervix, and Prostate Cancer Cells: Potential Mechanisms of Action. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, 6468–6473, 2009.

YOUNG, J.M.; MCNEILLY, A.S. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. **Reproduction**, v.140, p.:489-504, 2010.

YU; E. P. K.; BENNETT, M. R. Mitochondrial DNA damage and atherosclerosis. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 25, p. 481-487, 2014.

ZAVAREH, S.; TALEBI, A. ;HASANZADEH, H. Amending in vitro culture condition to overcome oxidative stress in assisted reproduction techniques (ART). **Journal of Paramedical Sciences**, v. 6, p. 135-148, 2015.





FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO  
**COMITÊ DE ÉTICA E DEONTOLOGIA EM ESTUDOS E PESQUIAS - CEDEP**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUA**

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Efeito do ácido protocatecuico sobre o desenvolvimento e a maturação *in vitro* de oócitos inclusos em folículos secundários ovinos isolados**", Protocolo nº 0002/170516, sob a responsabilidade de **Maria Helena Tavares de Matos**, estando de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Certify that the project entitled "**Effect of protocatechuic acid on the development and *in vitro* maturation of oocytes enclosed in sheep isolated secondary follicles**", protocol number nº 0002/170516, under the responsibility **Maria Helena Tavares de Matos**, being in accordance with the ethical principles of animal experimentation adopted by Ethics Committee on Animal Use at the Federal University of Vale do São Francisco.

Petrolina, 04 de julho de 2016.

Andréa Vieira Colombo – Coordenadora  
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA