



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CAMPUS DE SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA – PPGB

ERLANDIA MARCIA VASCONCELOS

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EUGENOL E DO ÓLEO ESSENCIAL DE
***Ocimum gratissimum* DURANTE O CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-**
ANTRAIS BOVINOS

SOBRAL-CE

2020

ERLANDIA MÁRCIA VASCONCELOS

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EUGENOL E DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocimum
gratissimum* DURANTE O CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS
BOVINOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Análises Integrativas de Sistemas Biológicos. Área temática: Fisiologia Reprodutiva.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Viana Silva

SOBRAL-CE

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- V45a Vasconcelos, Erlandia Márcia.
Avaliação dos efeitos do Eugenol e do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* durante o cultivo in vitro de folículos pré-antrais bovinos / Erlandia Márcia Vasconcelos. – 2020.
99 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2020.
Orientação: Prof. Dr. José Roberto Viana Silva.
1. Folículo. 2. cultivo in vitro. 3. Estresse oxidativo. 4. Antioxidante. 5. *Ocimum gratissimum*. I. Título.
CDD 660.6
-

ERLANDIA MARCIA VASCONCELOS

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EUGENOL E DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocimum gratissimum* DURANTE O CULTIVO IN VITRO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS
BOVINOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Análises Integrativas de Sistemas Biológicos. Área temática: Fisiologia Reprodutiva.

Aprovada em: 07/02/2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Roberto Viana Silva (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Geovany Amorim Gomes
Universidade Estadual do Vale do Acaraú (UVA)

Prof. Dr. Anderson Weiny Barbalho Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra Ana Liza Paz Souza Batista
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por guiar minha vida e me ajudar a tomar as melhores decisões, para que eu pudesse continuar a trilhar os caminhos que escolhi.

Ao IFCE – Campus Acaraú por me fornecer uma excelente formação e incentivo dos professores para que eu chegasse até aqui.

À Universidade Federal do Ceará –UFC, ao Laboratório de Biotecnologia Reprodutiva (LABIREP) e ao Núcleo de Biotecnologia de Sobral (NUBIS), pelo espaço e oportunidade.

Ao Prof. Dr. José Roberto Viana Silva, pela oportunidade de ingressar no grupo de pesquisa, pela confiança e ensinamentos.

Aos professores Anderson Weiny e Ana Liza por toda a ajuda, incentivo e ensinamentos durante esses dois anos de convivência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de mestrado.

Ao meu esposo Micael Silveira por todo o incentivo e apoio durante essa árdua caminhada.

A minha família por sempre me apoiarem e estarem presentes em todos os momentos da minha vida.

Aos meus queridos amigos que o mestrado me proporcionou, Venância, Pedro, Igo, Francisco, Laís e Bianca por sempre estarem disponíveis e dispostos a ajudar. Por todas as vezes em que foram amigos e família durante os momentos bons e ruins da pós-graduação.

A toda a equipe LABIREP–UFC e a todos que colaboraram e participaram direta ou indiretamente deste trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de diferentes concentrações do Eugenol e do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* sobre o crescimento, viabilidade, morfologia, formação de antro e expressão de mRNA para *SOD*, *CAT*, *GPX1*, e *PRDX6* em folículos secundários bovinos cultivados *in vitro*. Os ovários bovinos foram coletados em abatedouro local, em condições assépticas. No laboratório, os folículos foram isolados do córtex ovariano e cultivados em gotas de TCM-199+ sozinho ou suplementado com diferentes concentrações do óleo essencial de *O. gratissimum* (0,125%, 0,25% e 0,5%) e Eugenol (0,5, 5 e 50 µM). A troca do meio de cultivo foi feita a cada 2 dias e o registro fotográfico dos folículos foi feito nos dias 0, 6, 12 e 18, sendo observado a taxa de crescimento e formação de antro. Ao final do cultivo, os folículos foram submetidos à análise de viabilidade utilizando calceína e etídio homodímero. Os folículos foram utilizados para quantificar os níveis de RNA mensageiros para *SOD*, *CAT*, *GPX1* e *PRDX6*. Os dados referentes ao crescimento folicular foram submetidos a ANOVA, seguido do teste T. Para a análise da viabilidade folicular e formação de antro foi utilizado o teste Qui-quadrado ($p < 0,05$). Os dados de expressão de RNA mensageiros foram analisados utilizando o teste de Kruskal-Wallis não paramétrico ($p < 0,05$). Os resultados mostraram que os folículos secundários cultivados na presença do óleo essencial de *O. gratissimum* mantiveram morfologia, viabilidade e crescimento. A presença de 0,5% ou 0,25% de óleo essencial no meio de cultura aumentou significativamente os níveis de mRNAs para *PRDX6* e *CAT*. Folículos secundários cultivados com Eugenol mantiveram morfologia e viabilidade semelhantes ao grupo controle. Um aumento progressivo no diâmetro folicular foi observado entre os dias 0 e 12 em todos os tratamentos, exceto nos folículos cultivados com Eugenol 50 µM. 5,0 e 50 µM Eugenol aumentaram os níveis de mRNA para *PRDX6* nos folículos, mas 0,5 µM Eugenol reduziu os níveis de mRNA para *SOD* nos folículos cultivados. Eugenol não influenciou a expressão de mRNA para *CAT* e *GPX1*. Em conclusão, o óleo essencial de *O. gratissimum* aumenta os níveis de mRNAs para *PRDX6* e *CAT* em folículos secundários bovinos cultivados por 18 dias e mantém viabilidade, morfologia e crescimento. Eugenol reduz níveis de mRNAs para *SOD* e aumenta os níveis de *PRDX6* em folículos secundários bovinos os cultivados *in vitro*. O eugenol mantém a viabilidade e morfologia foliculares, mas reduz o crescimento folicular quando em alta concentração (50 µM).

Palavras-chave: Folículos. Cultivo *in vitro*. Estresse oxidativo. Antioxidante. *Ocimum gratissimum*.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the effects of different concentrations of Eugenol and the essential oil of *Ocimum gratissimum* on growth, viability, morphology, antrum formation and mRNA expression for *SOD*, *CAT*, *GPX1*, and *PRDX6* in secondary bovine follicles grown *in vitro*. Bovine ovaries were collected in a local slaughterhouse, under aseptic conditions. In the laboratory, the secondary follicles were isolated from the ovarian cortex and cultured in TCM-199 + drops alone or supplemented with different concentrations of the essential oil of *Ocimum gratissimum* (0.125%, 0.25% and 0.5%) and Eugenol (5, 10 and 50 μM). The culture medium was changed every 2 days and the photographic record of the follicles was done on days 0, 6, 12 and 18, with growth rate and antrum formation being observed. At the end of the cultivation period, the follicles were subjected to viability analysis using calcein (viable) and homodimer ethidium (non-viable). In addition, follicles were used to quantify messenger RNA levels for *SOD*, *CAT*, *GPX1* and *PRDX6*. The data on follicular growth were submitted to ANOVA, followed by the T test. For the analysis of follicular viability and antrum formation, the Chi-square test was used ($p < 0.05$). The messenger RNA expression data were analyzed using the nonparametric Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$). The results showed that the secondary follicles grown in the presence of the essential oil of *O. gratissimum* maintained morphology, viability and growth. In addition, the presence of 0.5% or 0.25% essential oil in the culture medium significantly increased the levels of mRNAs for *PRDX6* and *CAT*. Secondary follicles grown with Eugenol maintained similar morphology and viability to the control group. A progressive increase in follicular diameter was observed between days 0 and 12 in all treatments, except for follicles grown with 50 μM Eugenol. 5.0 and 50.0 μM Eugenol increased mRNA levels for *PRDX6* in follicles, but 0.5 μM Eugenol reduced mRNA levels for *SOD* in cultured follicles. Eugenol did not influence mRNA expression for *CAT* and *GPX1*. In conclusion, *O. gratissimum* essential oil increases the levels of mRNAs for *PRDX6* and *CAT* in secondary bovine follicles grown *in vitro* for 18 days and maintains their viability, morphology and growth. Eugenol reduces the levels of mRNAs for *SOD* and increases the levels of *PRDX6* in bovine secondary follicles grown *in vitro*. Eugenol maintains follicular viability and morphology, but reduces follicular growth when in high concentration (50 μM).

Keyword: Follicles. *In vitro* culture. Oxidative stress. Antioxidant. *Ocimum gratissimum*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Esquema ilustrativo do ovário mamífero e suas principais estruturas..... 19
Fonte: Junqueira; Carneiro (2013).
- Figura 2 – Visão geral da foliculogênese. A representação esquemática ilustra as diferentes classes do desenvolvimento folicular, incluindo folículos pré antrais: primordiais, primários e secundários, e folículos antrais: terciários e pré-ovulatórios..... 20
Fonte: Lima-Verde; Rosetto; Figueiredo (2011).
- Figura 3 – Representação esquemática da via de sinalização Nrf2/Keap1..... 29
Fonte: Hahn; Oliveira; Bock (2017).
- Figura 4 – Representação esquemática da formação de um radical livre, caracterizado pela perda de um elétron a partir de um átomo de oxigênio..... 31
Fonte: Mattos, 2019.
- Figura 5 – Esquema ilustrativo da ação de um antioxidante agindo na estabilização de um radical livre por meio da doação de um elétron..... 34
Fonte: Mattos, 2019.
- Figura 6 – Esquema ilustrativo da estrutura tridimensional e plana da molécula de Eugenol..... 38
Fonte: Adaptado de Linard (2008).

LISTA DE FIGURAS ARTIGO 1

- Figure 1** Viable bovine secondary follicles cultured for 18 days after staining with calcein-AM (green) and ethidium homodimer-1 (red). (A, B) Secondary follicle cultured in TCM 199+ (control). (C, D) Secondary follicle cultured in medium containing 0.5% OGEO. (E, F) Secondary follicle cultured in medium containing 0.25% OGEO. (G, H) Secondary follicle cultured in medium containing 0.125% OGEO. Bars = 50 μ m..... 54
- Figure 2** Levels of mRNA (means \pm SD) for (A) *SOD*, (B) *CAT*, (C) *PRDX6* and (D) *GPXI* in secondary follicles cultured *in vitro* for 18 days in TCM 199+ alone or supplemented with 0.5, 0.25 or 0.125% of OGEO. ^{abc} Represent significant differences between treatments (P<0.05)..... 55

LISTA DE FIGURAS ARTIGO 2

- Figure 1** Viability of bovine secondary follicles cultured for 18 days after staining with calcein-AM (green) and ethidium homodimer-1 (red). Secondary follicles cultured in TCM-199⁺ alone (a, b) or supplemented with 0.5 μ M, 5.0 μ M or 50.0 μ M of Eugenol (EUG). The scale bars represent 100 μ m..... 75
- Figure 2** Levels of mRNA (means \pm SD) for (A) SOD, (B) CAT, (C) PRDX6 and (D) GPX1 in secondary follicles cultured *vitro* for 18 days in TCM 199⁺ alone or supplemented with 0.5, 5.0 or 50.0 μ M of Eugenol (EUG). ^{a,b,c} Represent statistically significant differences between treatments (P < 0.05). 76

LISTA DE TABELAS ARTIGO 1

Table 1 Primer pairs used for real-time PCR.....	52
Table 2 Diameters and daily growth rate (mean \pm SD) of bovine secondary follicles after 0, 6, 12 and 18 days of <i>in vitro</i> culture in TCM-199 ⁺ alone or supplemented with 0.125, 0.25 or 0.5% of OGEO.....	53
Table 3 Percentage of morphologically normal secondary follicles and of antrum formation after 18 days of <i>in vitro</i> culture in TCM-199 ⁺ alone or supplemented with 0.125, 0.25 or 0.5% of OGEO.....	54

LISTA DE TABELAS ARTIGO 2

Table 1 Primer pairs used for real-time PCR.....	73
Table 2 Diameters and daily growth (Mean \pm SEM) of bovine secondary follicles after 0, 6, 12 and 18 days of <i>in vitro</i> culture in TCM-199 ⁺ alone or supplemented with 0.5, 5.0 or 50.0 μ M of Eugenol (EUG).....	74
Table 3 Percentages of morphologically normal secondary follicles and of antrum formation after 18 days of <i>in vitro</i> culture in TCM-199 ⁺ alone or supplemented with 0.5, 5.0 or 50.0 μ M of Eugenol (EUG).....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ARE	Elemento de Resposta Antioxidante
BHA	Butil Hidroxianisol
BHT	Butil Hidroxitolueno
BMP15	Proteína Morfogênia Óssea 15
BMP6	Proteína Morfogênia Óssea 6
BSA	Albumina Sérica Bovina
CAT	Catalase
CGP	Células Germinativas Primordiais
Cul3-Rbx1	E3-ubiquitin Ligase Complex/Ring Box Protein 1
EO	Estresse Oxidativo
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotofinas
GPX1	Glutationa Peroxidase 1
H ₂ O ₂	Peroxido de Hidrogênio
IA	Inseminação Artificial
ITS	Insulina Transferrina e Selênio
LH	Hormônio Luteinizante
MDA	Malondialdeído
MIV	Maturação in Vitro
MOIFOPA	Manipulação de Óocitos Inclusos em folículos Ovarianos Pré-antrais
MPGCLCs	Células semelhantes as células germinativas primordiais de rato
Nfr2	Fator Nuclear Eritroide 2 relacionado ao Fator 2
OE	Estresse Oxidativo
OH	Radical Hidroxila
PBS	Tampão Fosfato Salino
PIVE	Produção in Vitro de Embriões
PRDX6	Peroxiredoxina 6
Se-Gpx	Glutationa Peroxidase

SOD	Superóxido Dismutase
TCM-199	Meio de Cultivo Tecidual 199
TCM-199+	Meio de Cultivo Tecidual Suplementado
TE	Transferência de Embriões
TNFa	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TRAS	Tecnologias de Reprodução Assistida
Trx	Tiorredoxina
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
©	Copyright
®	Marca Registrada
1O2-	Oxigênio singleto
O2-	Radicais superóxidos ou ânion superóxido
O22-	Ânion peróxido
OH•	Radical hidroxil
μM	Micromolar
μL	Microlitro
mL	Mililitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
2.1 <i>Ovário bovino e dinâmica da formação e crescimento folicular.....</i>	19
2.2 <i>Cultivo in vitro de folículos pré-antrais.....</i>	23
2.3 <i>Influência das EROs no cultivo de folículos ovarianos e no desenvolvimento oocitário.....</i>	27
2.4 <i>Formação e ação de radicais livres.....</i>	30
2.5 <i>Mecanismos de ação dos agentes antioxidantes.....</i>	33
2.6 <i>Papel das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPX1 e PRDX6.....</i>	35
2.7 <i>Óleos essenciais como fontes de compostos antioxidantes.....</i>	36
2.8 <i>Caracterização química e atividade antioxidante do Eugenol.....</i>	38
3. JUSTIFICATIVA.....	40
4. HIPÓTESES.....	42
5. OBJETIVOS.....	43
5.1 <i>Objetivo geral.....</i>	43
5.2 <i>Objetivos específicos.....</i>	43
6. ARTIGO 1: Ocimum gratissimum essential oil (OGEO) increases the expression of mRNA for catalase (CAT) and peroxiredoxin 6 (PRDX-6) during in vitro culture of bovine secondary follicles.....	46
8. ARTIGO 2: Eugenol influences the expression of messenger RNAs for SOD and PRDX6 in bovine secondary follicles cultured in vitro.....	66
CONCLUSÕES GERAIS.....	84
PESPECTIVAS.....	85
REFERÊNCIAS.....	86

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o aumento da eficiência reprodutiva de animais de alto valor genético vem sendo propiciado em parte pelo desenvolvimento e melhoramento das biotécnicas da reprodução animal (RIBEIRO, 2016). Dentre essas biotécnicas, pode-se citar a produção *in vitro* de embriões (PIVE), a inseminação artificial (IA), a transferência de embriões (TE) e a manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA) (ANTONINO et al., 2017). O cultivo de folículos ovarianos é uma etapa da biotécnica de MOIFOPA e visa promover o crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais, bem como possibilitar estudos *in vitro* do efeito de diversas substâncias sobre o desenvolvimento folicular (PLAZAS, 2015).

Para bovinos e outras espécies domésticas, o desenvolvimento de sistemas de cultivo capazes de suportar o crescimento de folículos pré-antrais até a maturação e posterior fertilização do oócito, objetiva fornecer um maior número de oócitos para a produção *in vitro* de embriões, possibilitando o aumento no número de descendentes nascidos por animal (ARAÚJO, 2014). Avanços nos estudos sobre a foliculogênese inicial em bovinos podem favorecer o melhoramento genético, conservação da espécie e ainda aumentar a disponibilidade de informações relevantes que possam ser aplicadas também à reprodução humana (ANTONINO et al., 2017). No entanto, o cultivo de folículos ovarianos representa um desafio, uma vez que a maioria destes tornam-se gradualmente atrésicos durante a fase de cultivo *in vitro*, necessitando, portanto, de sistemas eficientes de cultivo que promovam o crescimento e minimizem a perda folicular (ARAÚJO, 2014; BECK et al., 2018).

A eficiência do cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais pode ser influenciada, entre outros fatores, pela exposição às espécies reativas do oxigênio (EROs) que podem ser aumentadas em condições *in vitro*. Isso pode ocasionar danos mitocondriais, peroxidação lipídica e comprometimento da integridade celular, resultando assim, em diminuição da qualidade oocitária e dos embriões produzidos. Desse modo, os meios de cultivo necessitam ser suplementados com antioxidantes que possam prevenir ou minimizar os danos provocados pelo estresse oxidativo (EO) (KASHKA; ZAVAREHI; LASHKARBOLOUKI, 2016; LINS et al., 2017). Para isso, selênio, ácido ascórbico e transferrina têm sido utilizados frequentemente nos meios de cultivo com esta função (SANTOS et al., 2014). No entanto, fontes alternativas de componentes para os meios de cultivo, a exemplo dos extratos vegetais utilizadas na medicina natural, apresentam elevado potencial como suplementos para os meios de cultivo, principalmente devido às suas propriedades antioxidantes (GOUVEIA et al., 2016; TAG et al., 2015).

A suplementação do meio de cultivo de folículos ovarianos com rutina (vitamina P), como único antioxidante, auxiliou na manutenção da viabilidade folicular (LINS et al., 2017). Além disso, Rocha (2017) demonstrou que o uso de resveratrol como antioxidante durante procedimento de criopreservação de tecido ovariano favoreceu a manutenção da viabilidade tecidual e diminuiu os níveis de EROs durante vitrificação. Entre os componentes obtidos de plantas utilizadas na medicina tradicional com capacidade antioxidante, merece destaque os óleos essenciais das espécies do gênero *Ocimum*. O óleo essencial de *Ocimum gratissimum* possui uma grande variedade de componentes fitoquímicos, responsáveis por suas diversas características fisiológicas, incluindo atividade anti-inflamatória, antimicotoxigênica e antioxidante. Entre os componentes presentes nesse óleo, estão compostos voláteis como eugenol e timol (BHAVANI et al., 2019). O estudo de Joshi (2013) mostrou alta atividade antioxidante do óleo essencial de *O. gratissimum*, efeito atribuído ao alto teor de eugenol (> 75%) presente no óleo. Além disso, atividades antioxidantes de *O. gratissimum* também foram relatadas por Bhatt et al., (2019) e Prakash et al., (2010).

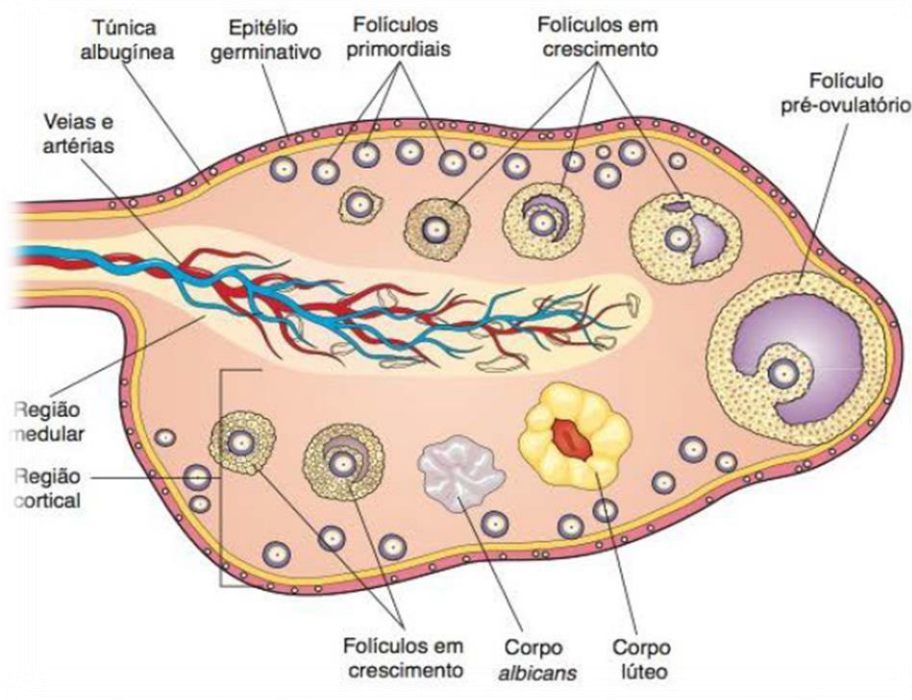
Para um maior esclarecimento da importância deste trabalho, a seguir serão discutidos aspectos relacionados a: (1) ovário bovino e dinâmica da formação e crescimento folicular, (2) cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, (3) formação e ação de radicais livres, (4) mecanismos de ação dos agentes antioxidantes, (5) óleos essenciais como fontes de compostos antioxidantes, (6) influência das EROs no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos, (7) Atividade antioxidante do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* e (8) Caracterização química e atividade antioxidante do Eugenol.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Ovário bovino e dinâmica da formação e crescimento folicular

O ovário mamífero (Figura 1) é caracterizado por possuir duas regiões principais, denominadas região cortical e medular. A região medular é rica em vasos sanguíneos que são necessários para a suplementação do órgão. A região cortical, por sua vez, é caracterizada por abrigar os folículos ovarianos nos seus diferentes estágios de desenvolvimento. Duas funções importantes são atribuídas ao ovário mamífero: a produção de células germinativas (oócitos), as quais são responsáveis pela continuação da espécie, e a geração de produtos bioativos, principalmente esteroides e fatores de crescimento, essenciais para o funcionamento ovariano, controle da regulação do eixo hipotálamo-pituitário-ovariano, bem como para o desenvolvimento de características sexuais secundárias (EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009). Nos ovários, estão presentes milhares de oócitos, inclusos em sua maioria (cerca de 90%) em folículos pré-antrais que podem ser diferenciados entre si pelo número de células somáticas que os circundam (FIGUEIREDO et al., 2007a).

Figura 1: Esquema ilustrativo do ovário mamífero e suas principais estruturas.

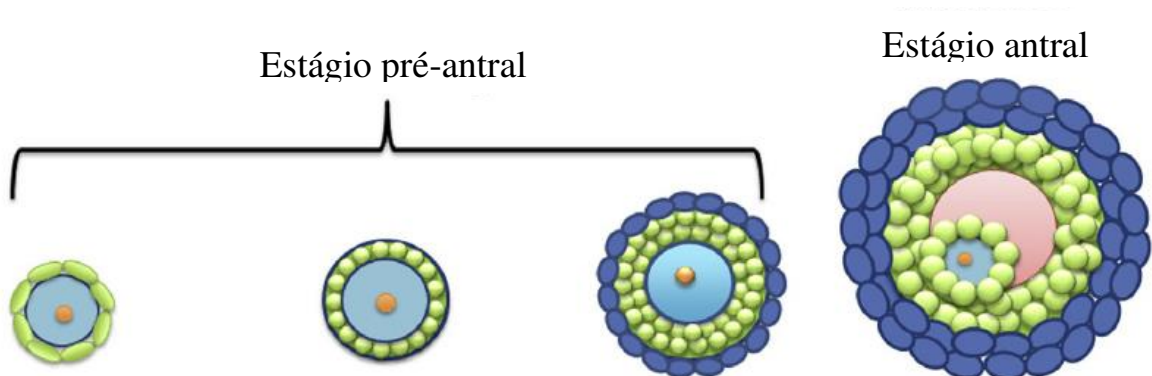


Fonte: Junqueira; Carneiro (2013).

A função ovariana está associada a um rigoroso controle de hormônios e fatores de crescimento (SPITSCHAK; HOEFLICH, 2018). O hormônio folículo-estimulante (FSH) e luteinizante (LH) possuem papéis essenciais para a função ovariana, e seus níveis sofrem variação ao longo de todo o ciclo estral (SIRARD, 2016). Os hormônios hipofisários controlam a maioria das funções ovarianas. O FSH age estimulando o crescimento folicular e a produção de estrógeno pelas células da granulosa. O LH por sua vez, é responsável por induzir à ovulação. Além disso, após a ovulação do oócito, o LH atua transformando a camada de células da granulosa e da teca interna no corpo lúteo, uma glândula endócrina responsável pela secreção de progesterona, que auxilia na manutenção da gravidez. O estrógeno e a progesterona, produzidos no ovário, atuam no hipotálamo e podem estimular ou inibir a secreção do hormônio liberador de gonadotropina (GnRH).

A foliculogênese envolve o processo de formação, crescimento e maturação folicular, iniciando ainda na vida fetal (Figura 2). Seu início é caracterizado pela produção de folículos primordiais, que durante o desenvolvimento passam pelos estágios de folículos primários, secundários, terciários e finalmente chegam ao estágio pré-ovulatório, fase que termina com a ovulação do oócito maduro (ADONA et al., 2012; SAUMANDE, 1981). Dessa forma, os folículos ovarianos são caracterizados como complexos em fases transitórias possuindo um oócito circundado por células somáticas (células da granulosa e tecais) e são responsáveis por determinar o ciclo reprodutivo (SPITSCHAK; HOEFLICH, 2018).

Figura 2: Visão geral da foliculogênese. A representação esquemática ilustra as diferentes classes do desenvolvimento folicular, incluindo folículos pré-antrais: primordiais, primários e secundários, e folículo antral: pré-ovulatório.



Fonte: Green; Shikanov (2016).

O processo de formação folicular tem início no período fetal na maioria das espécies de mamíferos, incluindo primatas e ruminantes e ocorre em paralelo ao processo de oogênese

(KNIGHT; GLISTER, 2001). Ao final do primeiro mês de desenvolvimento embrionário em mamíferos, as células germinativas primordiais (CGP) migram do saco vitelino até os primórdios gonadais, onde começam a se desenvolver as gônadas. Nas gônadas, essas células se dividem, se transformando em oogônias. Essa divisão é bastante intensa, existindo no segundo mês de vida intrauterina, aproximadamente 600 mil oogônias e, por volta do quinto mês, mais de 7 milhões. No terceiro mês, as oogônias entram no estágio de prófase da primeira divisão meiótica, no entanto, param na fase de diplóteno e não progridem para as fases seguintes, da meiose. As células na fase de diplóteno, constituem os oócitos que são envolvidos por uma camada de células da granulosa achatadas (folículos primordiais) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Na puberdade, devido à liberação do pico pré-ovulatório de FSH e LH, ocorre uma progressão da divisão meiótica, com isso, são formados os oócitos secundários e ocorre outra parada na fase de metáfase II. Após a fecundação do oócito pelo espermatozoide a meiose é retomada novamente e a partir disso, origina-se o oócito haplóide fecundado, chegando ao final da oogênese (FIGUEIREDO et al., 2008).

Em bovinos, a formação folicular também ocorre durante a vida fetal. Nessa espécie, a primeira prófase meiótica tem início entre os dias 75 e 80 de gestação. No estágio de diplóteno da meiose, no período de 150 e 180 dias de gestação, os folículos primordiais se formam, e os oócitos presentes nesses folículos permanecem quiescentes até serem ativados para a fase de crescimento (MELLO et al., 2013).

A ativação folicular tem início quando ocorre a retomada da proliferação de células da granulosa. Os folículos primordiais passam a apresentar estas células em formato cuboide, dando origem aos folículos em transição que são caracterizados pela presença de células da granulosa tanto em formato cúbico, quanto achatado. Em seguida, passam para o estágio de folículo primário, quando o oócito passa a ser circundado apenas por células em formato cúbico. Além de alterações no formato das células da granulosa, ocorre aumento no volume do citoplasma e núcleo do oócito. Contudo, os mecanismos responsáveis pela ativação e crescimento folicular ainda permanecem como um campo de constante investigação (GOUGEON; BUSSO, 2000; HIRSHFIELD, 1991; MARTINS et al., 2008).

Durante a foliculogênese os folículos passam a interagir com as células da granulosa, essa interação tem início no estágio de folículo primário e é essencial para o desenvolvimento folicular e oocitário, processos os quais são amplamente regulados por fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos e, a comunicação bidirecional existente entre as células somáticas e o oócito é o que permite a formação de um microambiente único ao redor do oócito,

que é essencial para o crescimento folicular e competência oocitária (GREEN; SHIKANOV, 2016).

A partir do estágio de folículo primário, as células da granulosa sofrem intensa multiplicação dando origem a mais uma camada de células e formando os folículos secundários. Nos folículos secundários o oócito encontra-se cercado por duas ou mais camadas de células da granulosa cuboides, o núcleo do oócito passa a se posicionar de forma excêntrica e as organelas celulares movem-se posicionando-se periféricamente. No decorrer do desenvolvimento folicular a zona pelúcida se torna espessa e visível e com o crescimento dos folículos secundários e organização das células da granulosa, tem-se início a formação de uma cavidade contendo líquido, denominada antro. Uma vez formada a cavidade antral, os folículos são denominados terciários ou antrais (LUCCI et al., 2001; ROSSETTO et al., 2011). A maioria da população folicular, cerca de 90 a 95% são de folículos pré-antrais, correspondendo ao maior estoque de oócitos em ovários mamíferos (FIGUEIREDO et al., 2007a). Os folículos pré-antrais formam o *pool* de reserva de folículos em estado quiescente. Após passarem por ativação, ou seja, saírem da fase de quiescência, passam por um processo sequencial de crescimento que é regulado por diversos hormônios e fatores de crescimento (HICKEY et al., 2005). A maioria destes folículos, no entanto (99,9%) não chega à fase pré-ovulatória, morrendo por um processo natural denominado atresia folicular (FIGUEIREDO et al., 2007a).

Alguns eventos acerca da foliculogênese na fase pré-antral permanecem não elucidados, como os mecanismos envolvidos na inibição ou ativação folicular e aqueles envolvidos no controle do crescimento de folículos primários e secundários (FIGUEIREDO et al., 2007a). Trata-se de um processo extremamente complexo, sendo necessário a compreensão dos fatores envolvidos na regulação do funcionamento celular, os quais possuem papel fundamental no processo de reprodução. O entendimento desses eventos permite aumentar a reprodução de animais domésticos, bem como desenvolver métodos diagnósticos para casos de infertilidade, além do incremento de métodos contraceptivos mais eficientes e seguros (DE CESARO, 2017).

Na espécie bovina o desenvolvimento dos folículos antrais segue um padrão conhecido como onda de crescimento folicular, que possui três diferentes fases. Na primeira fase, conhecida como recrutamento, inicia-se o crescimento de vários folículos sob o controle das gonadotrofinas. A fase seguinte, de seleção e dominância é caracterizada pelo crescimento de um folículo em relação aos demais, tornando-se dominante. Durante essa fase o crescimento folicular está condicionado à presença de FSH e LH. Além disso, o folículo dominante é responsável pela produção de elevada quantidade de estrógeno. A terceira fase diz respeito à

ovulação, que acontece em decorrência do pico elevado de LH liberado pela hipófise. Para que a fase ovulatória ocorra é necessário além do aumento nos níveis de estrógenos, a diminuição dos níveis de progesterona. Dessa forma, havendo a presença de um corpo lúteo funcional, o qual é responsável pela produção de progesterona, não haverá ovulação. Após a ovulação, os folículos que não ovularem serão mortos por atresia (OLIVEIRA; SARAPIÃO; QUINTÃO, 2014).

2.2 Cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais

Na maioria das espécies de mamíferos, incluindo bovinos, os folículos ovarianos podem ser isolados e cultivados *in vitro* (FIGUEIREDO et al., 2007b). O isolamento pode ser feito através do método enzimático ou mecânico. No método enzimático, são utilizadas enzimas digestivas, como colagenase, tripsina e DNase, que digerem o estroma ovariano possibilitando o isolamento de um elevado número de folículos. No entanto, esse método pode ser danoso às células da teca ou a membrana basal, o que pode comprometer a estrutura folicular. No método mecânico são utilizados equipamentos como tesouras cirúrgicas, tissue chopper, micro fórceps e agulhas dissecantes para isolamento dos folículos contidos em fragmentos ovarianos, e, apesar de o método mecânico resultar em menor número de folículos isolados em relação ao método enzimático, ele preserva melhor a estrutura das células da teca e da membrana basal (ROSSETTO et al., 2011). Além disso, é possível preservar também por esse método, os receptores de superfície, bem como a interação entre os diferentes compartimentos foliculares (KURUVILLA, 2010).

Durante o cultivo *in vitro*, os folículos passam pelos estágios de crescimento e maturação a fim de produzir oócitos maduros e competentes à fase de fertilização (FIGUEIREDO et al., 2007b). Com isso, nos últimos anos diversos estudos têm relatado tentativas de produzir oócitos competentes cultivados *in vitro* a partir de folículos pré-antrais (SILVA; VAN DEN HURK; FIGUEIREDO, 2016), e o desenvolvimento de técnicas de Reprodução Assistida (TRAs) têm propiciado avanços no tratamento de infertilidade em humanos, bem como na reprodução de animais de elevado valor genético (CASTRO, 2015).

Resultados promissores têm sido alcançados com o cultivo *in vitro* de fragmentos de tecido ovariano ricos em folículos primordiais, seguido de isolamento e cultivo de folículos secundários desenvolvidos *in vitro*, o que permitiu nascimento de ratos saudáveis após fertilização *in vitro* (O'BRIEN; PENDOLA; EPPIG, 2003). Além disso, o estudo de Yamashiro et al. (2018) possibilitou a reconstituição da foliculogênese *in vitro* em murinos, através da

formação de células semelhantes às células germinativas primordiais de rato (MPGCLCs), a partir de células tronco pluripotentes induzidas (miPSCs), resultando em descendentes férteis nessa espécie.

Apesar dos resultados já alcançados em murinos, em que a produção *in vitro* de oócitos competentes à fase de fertilização *in vitro* atingiu resultados satisfatórios, o número de embriões produzidos após o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais de animais de maior porte, como a espécie bovina por exemplo, ainda é baixo. Esses resultados podem ser atribuídos aos complexos mecanismos moleculares que ocorrem durante as fases de crescimento e diferenciação do oócito e que incluem diversos hormônios e fatores de crescimento (BARBONI et al., 2011; SILVA; VAN DEN HURK; FIGUEIREDO, 2016). A disparidade de resultados obtidos na produção *in vitro* de embriões de murinos em relação as outras espécies pode estar relacionada às diferenças no tempo necessário para a foliculogênese, que em murinos dura cerca de 21 dias (LUSSIER; MATTON; DUFOUR, 1987; SILVA et al., 2015). Em bovinos e ovinos, no entanto, esse período dura em média quatro a seis meses (CAMPBELL et al., 2003; HUNTER et al., 2004).

Gupta et al. (2008) relatou a produção de embriões de búfalos a partir de folículos secundários cultivados *in vitro* por um período de 100 dias, propondo a necessidade de um período mais extenso durante a fase de cultivo *in vitro* de folículos secundários. Na espécie ovina também foi registrado produção *in vitro* de embriões a partir de folículos secundários (ARUNAKUMARI; SHANMUGASUNDARAM; RAO, 2010). Contudo, apesar dos resultados supracitados, o número de embriões formados a partir de folículos pré-antrais cultivados *in vitro* é consideravelmente baixo nessas espécies (SILVA et al., 2015). Além disso, em bovinos os resultados do cultivo de folículos pré-antrais têm sido limitados apenas à formação da cavidade antral (MCLAUGHLIN et al., 2010).

Diversos fatores como a procedência dos ovários, suplementação dos meios de cultivo e sistema de cultivo adotado, influenciam no sucesso da foliculogênese *in vitro* (SILVA et al., 2015). Em caprinos, o estudo de Araújo *et al.* (2010) mostrou que a suplementação do meio de cultivo com o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) melhorou a retomada meiótica de oócitos inclusos em folículos secundários cultivados *in vitro*. Silva et al. (2015) relataram vários estudos que possibilitaram a produção de embriões caprinos com a adição de diferentes fatores de crescimento aos meios de cultivo. Saraiva et al. (2010) produziu embriões caprinos a partir de folículos secundários cultivados por 18 dias em diferentes e crescentes concentrações de FSH, mostrando que a adição de concentrações aumentadas de FSH (meio sequencial) possui impacto significativo no desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais

caprinos. Araújo et al. (2016) mostraram que a presença da Proteína Morfogênica Óssea BMP-6 (1 ng/ml) no meio de cultivo influencia positivamente na formação de antro em folículos pré-antrais de caprinos, bem como na expressão de mRNA para receptores de BMP-6 e suas proteínas de sinalização intracelular.

Em ovinos, Lima et al. (2013) mostraram que o cultivo de folículos secundários na presença de FSH adicionado ao meio de cultivo em intervalos de 24 horas promoveu a manutenção da viabilidade, a ativação e crescimento folicular durante um período de 07 dias. Além disso, os resultados promissores de estudos envolvendo o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais nessa espécie têm contribuído de forma substancial para o incremento da produção *in vitro* de embriões (PIV) em outras espécies, especialmente no que se refere aos sistemas de cultivo *in vitro* (ROCHA et al., 2014). Dentre as contribuições, pode-se citar o co-cultivo de embriões e células do oviduto, bem como a redução de tensões de oxigênio (3-9%) durante o cultivo *in vitro* de embriões ovinos, técnicas que foram posteriormente empregadas para a produção *in vitro* de embriões bovinos (BERNARDI, 2005).

No que diz respeito a espécie bovina, Cunha et al. (2017) mostrou que a presença da Proteína Morfogênica Óssea 4 (BMP-4) (100 ng BMP4 /mL) durante o cultivo dos folículos em fragmentos de tecido ovariano promoveu um aumento dos diâmetros folicular e oocitário de folículos primários e secundários após um período de 06 dias de cultivo *in vitro*, além de promover a manutenção da viabilidade folicular. Silva et al. (2017a), mostraram que a adição do Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) (10 ng/mL) durante o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos bovinos diminui a sobrevivência folicular e aumenta o número de células apoptóticas no tecido do ovário após 06 dias de cultivo. Já a presença de dexametasona (10 ng/mL) nos meios de cultivo auxilia na manutenção da ultraestrutura dos folículos nos tecidos cultivados. Em estudo sobre os efeitos do tratamento *in vivo* com GnRH na expressão de mRNA para o sistema IL-1 β em células da granulosa, Silva et al. (2017b) demonstraram que o aumento de LH estimula um aumento nos níveis de mRNA para IL-1RA em células da granulosa de folículos pré-ovulatórios nos últimos estágios da ovulação.

O sucesso da foliculogênese *in vitro* depende entre outros fatores, do adequado emprego de técnicas de cultivo. Por esse motivo, o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais até fases competentes à fertilização, está diretamente relacionado à utilização de métodos eficientes para o isolamento correto dos folículos, evitando danos à estrutura e promovendo a sobrevivência folicular. Além disso, para que os folículos possam se desenvolver *in vitro* é fundamental o desenvolvimento de sistemas de cultivo que promovam a manutenção da sobrevivência e suportem o crescimento dos oócitos presentes nos folículos pré-antrais até a

fase de completa maturação. A execução correta das etapas supracitadas, pode potencializar a reprodução assistida de animais de alto valor genético fornecendo milhares de oócitos que poderão ser utilizados na produção *in vitro* de embriões e para as demais biotécnicas reprodutivas (ROSSETTO et al., 2011).

Em contraste com o que ocorre em animais de pequeno porte, em que o tamanho pequeno dos ovários permite o cultivo do órgão inteiro, em animais de grande porte o cultivo de folículos ovarianos pode ser feito em fragmentos do ovário (cultivo *in situ*) ou de forma isolada (ROSSETTO et al., 2011). O cultivo *in situ* apresenta como vantagem uma simulação das condições *in vivo*, uma vez que o folículo encontra-se em contato com as células do estroma ovariano, da teca e da granulosa e pode manter a forma tridimensional, condição semelhante à observada no ambiente natural (ARAÚJO et al., 2014). Contudo, apesar de os folículos primordiais presentes nesse sistema de cultivo apresentarem expressiva ativação, o número de folículos que chegam ao estágio secundário é pequeno (FORTUNE, 2003).

O cultivo de folículos isolados possibilita um acompanhamento do desenvolvimento individual dos folículos, além de permitir maior contato do meio de cultivo contendo substâncias de interesse com a estrutura folicular. O cultivo isolado pode ser feito de duas formas: utilizando o modelo bidimensional (2D) ou tridimensional (3D). No cultivo 2D o folículo cresce diretamente sobre a placa de cultivo ou sobre uma monocamada de substrato, que pode ser constituída por uma matriz extracelular ou componentes do estroma ovariano, incluindo células da granulosa e fibroblastos. No modelo 3D, o cultivo folicular é feito inserindo-se o folículo dentro do substrato, comumente uma matriz de hidrogel (ARAÚJO et al., 2014).

Durante o cultivo no modelo bidimensional, os folículos tendem a se aderir à placa de cultivo, resultando numa mudança de conformação na estrutura tridimensional dos folículos, que ocorre devido a migração das células somáticas a partir do oócito. Esse fenômeno prejudica a comunicação entre as células somáticas e o oócito, afetando o desenvolvimento folicular (GREEN; SHIKANOV, 2016). O sistema 3D por sua vez, tem sido utilizado comumente para o cultivo folicular por permitir a manutenção da morfologia tridimensional dos folículos, bem como as interações célula-célula e célula-matriz, importantes para a regulação do desenvolvimento folicular (ARAÚJO et al., 2014).

2.3 Influência das EROs no cultivo de folículos ovarianos e no desenvolvimento oocitário

O cultivo *in vitro* de folículos ovarianos afeta as células de diversas maneiras, sendo uma delas através do estresse oxidativo. Durante o cultivo de folículos ovarianos *in vitro*, fatores como a manipulação, ausência de mecanismos fisiológicos de proteção das células e aumento dos níveis de oxigênio no meio celular podem induzir danos causados pelo estresse oxidativo. Folículos cultivados *in vitro* apresentam capacidade menor de desenvolvimento quando comparados aos cultivados *in vivo*. Isso, porque em condições *in vitro*, os folículos podem ser expostos a concentrações de oxigênio superiores às fisiológicas (20%) (SÁ et al., 2018). Esses danos incluem peroxidação dos lipídios de membrana, lesões mitocondriais e degeneração celular, resultando em uma baixa produção de oócitos competentes para etapas subsequentes, como a fertilização *in vitro*. A produção de subprodutos da peroxidação lipídica como o malondialdeído (MDA) pode ainda provocar reações destes com outros componentes celulares incluindo proteínas e ácidos nucleicos e levar à disfunção celular (KASHKA; ZAVAREH; LASHKARBOLOUK, 2016; HALLIWELL, 2014). Além disso, durante a maturação *in vitro* (MIV), as EROs podem provocar efeitos como apoptose e bloqueio no desenvolvimento embrionário (CHEN et al., 2017).

Durante o desenvolvimento folicular, as células da granulosa podem apresentar crescimento anormal e perda da função devido o estresse oxidativo, esses danos levam à apoptose dessas células, e, por conseguinte, à atresia folicular, resultando em disfunção oocitária (ZHANG et al., 2016; LI et al., 2016; LEE et al., 2013). O estresse oxidativo nos meios de cultivo pode ser provocado pela geração excessiva de EROs e pela diminuição da defesa antioxidante das células, que ocorre entre outros fatores, pela ausência de componentes antioxidantes como o α -tocoferol (Vitamina E) e o ascorbato (Vitamina C) obtidos na alimentação (HALLIWELL, 2014).

As EROs estimulam o dano celular e as mitocôndrias são as primeiras organelas a sofrerem degeneração, visto serem o local onde são produzidos os radicais de oxigênio. Assim, o dano provocado às mitocôndrias pelas EROs leva à degeneração das células da granulosa e a uma diminuição na qualidade do folículo ovariano (SHI et al., 2016).

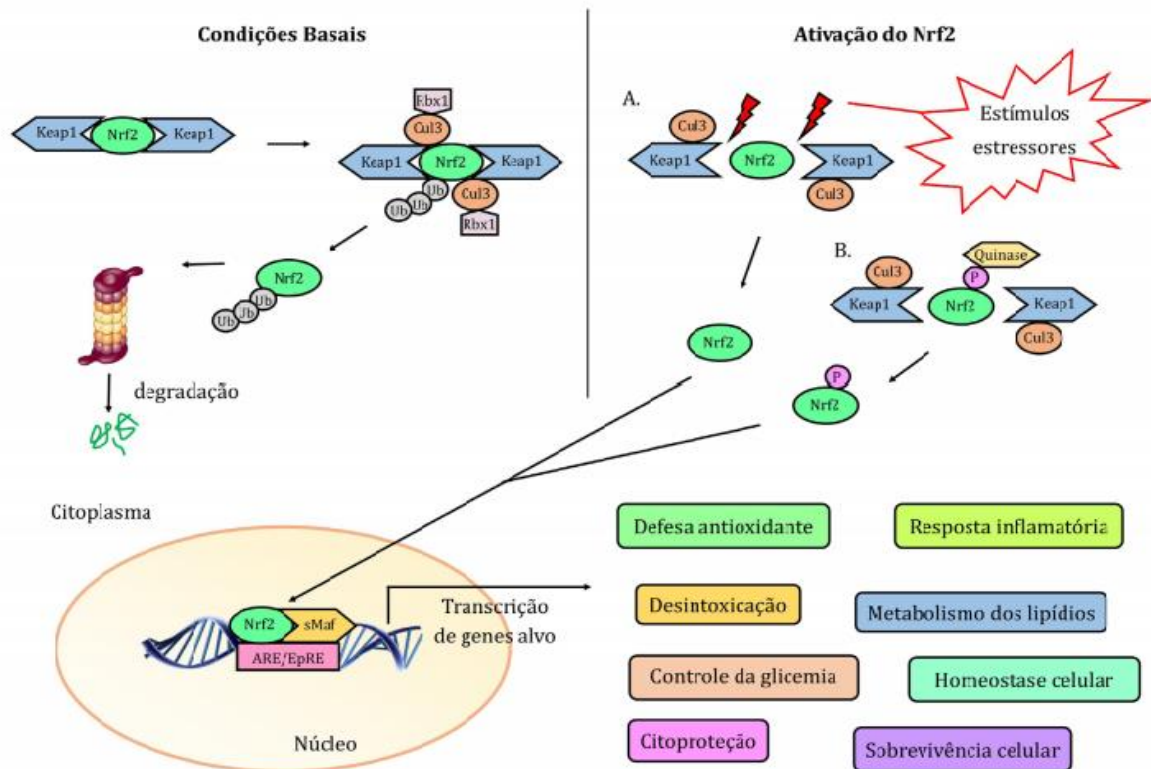
Estudos demonstraram que a apoptose induzida pelo estresse oxidativo em células da granulosa resulta na redução dos níveis de estradiol e em atresia folicular (GHATEBI et al., 2019). Foi observado que o estresse oxidativo é capaz de interromper a comunicação entre oócitos e células da granulosa promovendo uma diminuição da qualidade dos oócitos (CHAUBE; SHRIVASTAV; PRASAD, 2014). Evidências apontam ainda que as EROs são

capazes de induzir várias vias de apoptose mitocondrial através da ativação de receptores de morte localizados nas membranas celulares, ocorrendo assim, a indução da proteína quinase ativadora de mitógenos e da via das caspases (CHANDRA; SAMALI; ORRENIUS, 2000).

As células apresentam diversos mecanismos de defesa em resposta ao estresse oxidativo. Tem-se proposto que elas podem, inclusive, responder transcricionalmente através da ativação do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) (Figura 3), uma vez que essa via desempenha papel central na indução da expressão de genes de enzimas antioxidantes (SOHEL et al., 2017). Essa resposta transcricional pode ser mediada por exossomos, vesículas extracelulares multifuncionais que atuam na regulação das funções biológicas. Em condições de estresse oxidativo, essas vesículas são liberadas e exercem uma sinalização para células receptoras, que alteram seus mecanismos de defesa e evitam a morte celular. Durante a foliculogênese em bovinos foi demonstrado que os exossomos são importantes, pois participam da comunicação bidirecional entre as células da granulosa e o oócito, protegendo as células em condições de estresse oxidativo (SAEED- ZIDANE, et al., 2017).

Em condições homeostáticas, (Nrf2) encontra-se no citoplasma das células ligado a duas proteínas Keap1 (Kelch-like ECH-associated Protein 1) conhecidas ainda como inibidores naturais do Nrf2 (iNrf2), que funcionam como intermediárias para a promoção da ligação do complexo Cul3-Rbx1 (E3-ubiquitin ligase complex/Ring box protein 1) responsável pela ubiquitinação do Nrf2. Quando formado o complexo, Nrf2 permanece inativo e possui tempo de meia vida de cerca de 20 minutos no citoplasma, sendo degradado via proteossoma 26S (MIMURA; ITOH, 2015; SAEED-ZIDANE et al., 2017). No entanto, em situações de estresse como a exposição a altas taxas de EROs, resíduos reativos de cisteína são oxidados em Keap1, promovendo modificações na conformação de Keap1 e, por conseguinte, a liberação do Nrf2. Uma vez livres, as moléculas de Nrf2 posicionam-se no núcleo celular associando-se às proteínas sMaf (small musculoaponeurotic fibrosarcoma). Esse complexo liga-se então ao elemento de resposta antioxidante (ARE) ou ao elemento de resposta eletrofílica (EpRE), situados na região promotora dos genes alvos. Dessa forma, o complexo Nrf2/sMaf, ao se ligar em ARE ou EpRE, promove o início do processo de transcrição dos genes, entre eles aqueles relacionados à defesa antioxidante, incluindo peroxiredoxina-1 (PRDX1), catalase (CAT), superóxido dismutases (SODs) e tioredoxina-1 (TXN) (SOHEL et al., 2017; NITURE; KHATRI; JAISWAL, 2014).

Figura 3 – Representação esquemática da via de sinalização Nrf2/Keap1. Em condições de homeostase o Nrf2 permanece no citoplasma ligado a duas moléculas de Keap1. A associação com Keap1 possibilita a formação do complexo com Cul3-Rbx1, marcando o Nrf2 para degradação via proteossoma 26S. Em resposta a estímulos estressores: A) cisteínas reativas em Keap1 são oxidadas e as B) proteínas quinases fosforilam diretamente o Nrf2. As duas formas de ativação interrompem o efeito inibitório de Keap1 e permitem que o Nrf2 fique livre para migrar para o núcleo celular e se ligar com sMaf e ARE/EpRE, promovendo a transcrição de diversos genes, incluindo aqueles envolvidos na defesa antioxidante.



Fonte: Hahn et al. (2017).

O mecanismo primário responsável pelo declínio da qualidade dos oócitos em função da idade é a acumulação de danos às mitocôndrias provocados por espécies reativas de oxigênio e que são produzidas pelas próprias mitocôndrias durante o metabolismo biológico diário (BENTOV et al., 2011). Assim, distúrbios na função mitocondrial e outros fatores como o estresse do retículo endoplasmático e redução da capacidade antioxidante podem estar envolvidos na progressão do envelhecimento oocitário (ZHANG et al., 2019). Durante a maturação *in vitro* (MIV), as EROs podem provocar efeitos como apoptose e bloqueio no desenvolvimento embrionário (CHEN et al., 2017).

Em condições normais, as espécies reativas de oxigênio desempenham funções essenciais para o desenvolvimento do oócito e para o processo de ovulação. Seguindo à etapa de maturação folicular, que é mediada por FSH, ocorre um aumento repentino de LH estimulando os receptores de LH em células da granulosa e do cúmulus, isso resulta na geração de EROs e na diminuição das defesas antioxidantes. Essa resposta é fundamental para a indução da

apoptose em células da granulosa e conseqüentemente para o rompimento da parede folicular, permitindo a liberação do oócito durante a ovulação (RIZZO et al., 2012; PANDEY; CHAUBE, 2014). As EROs também têm sido associadas a papéis importantes no recomeço da meiose por meio da ativação do fator promotor da maturação (MPF) (TRIPATHI et al., 2009; PANDEY; CHAUBE, 2014).

Evidências apontam que as EROs influenciam, de acordo com seus níveis, a fisiologia dos oócitos, controlando a retomada e a parada do ciclo celular meiótico e a morte celular. Níveis moderados de EROs, desencadeiam a retomada meiótica do oócito da fase de diplóteno, bem como a parada em M-II, e a suplementação do meio com antioxidantes inibe a retomada espontânea sob condições de cultivo *in vitro* (CHAUDHARY et al., 2019). Assim, o estresse oxidativo pode provocar morte celular e dificultar a maturação nuclear e citoplasmática em oócitos (WHITAKER; KNIGHT, 2008). Estudos mostraram que o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) possui duplo efeito durante o desenvolvimento oocitário e embrionário. Em ratos, a exposição a baixas concentrações de H_2O_2 é capaz de induzir ao recomeço da meiose em oócitos imaturos cultivados *in vitro*. Em contrapartida, concentrações mais elevadas de (H_2O_2) induzem à parada do ciclo celular e apoptose em oócitos e embriões de ratos (TRIPATHI et al., 2009).

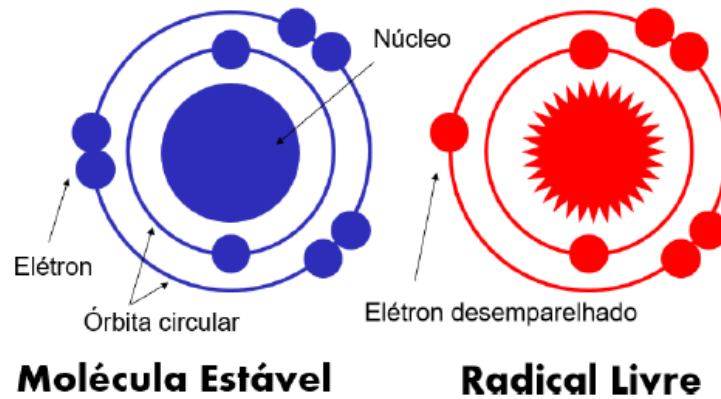
Os oócitos produzem EROs continuamente durante o seu crescimento e desenvolvimento, no entanto, o processo de maturação *in vitro* (MIV) aumenta a produção de EROs devido ao manejo, exposição a maiores taxas de oxigênio, luz e outros fatores (ZHANG et al., 2019). E, apesar de as EROs serem um produto normal do metabolismo celular, o seu excesso provoca danos ao DNA, disfunção mitocondrial e modificação da oxidação de proteínas, isso resulta em baixa qualidade de oócitos e bloqueio do seu potencial de desenvolvimento (TAMURA et al., 2008; RAJANI et al., 2012).

2.4 Formação e ação de radicais livres

Espécies reativas são formas moleculares caracterizadas pela perda de um ou mais elétrons em sua última camada eletrônica, razão pela qual possuem alta reatividade. Essas moléculas englobam espécies radiculares e não radiculares do oxigênio e do nitrogênio, conhecidas como espécies reativas do oxigênio (ERO) e espécies reativas do nitrogênio (ERN), que podem ser obtidas do meio ambiente ou produzidas endogenamente no organismo (Figura 4). O desequilíbrio entre a produção e eliminação dessas espécies resulta no estresse oxidativo,

podendo comprometer biomoléculas como proteínas, DNA, RNA e componentes das membranas celulares (FILIPOVIC et al., 2015; BARREIROS et al., 2006).

Figura 4: Representação esquemática de uma molécula estável, com elétrons associados em pares e um radical livre, contendo um elétron desemparelhado na camada de valência.



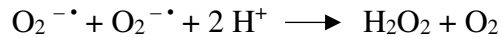
Fonte: Mattos (2019).

As espécies reativas do oxigênio (ROS) surgem como produto da oxidação, reação fundamental para o metabolismo celular aeróbico e entre os danos mais agressivos ocasionados por essas espécies pode-se citar mutação na estrutura do DNA e oncogênese (ANGELI, 2011). De maneira geral, a estrutura do DNA pode sofrer reestruturação devido danos causados à cadeia pelos radicais livres e, por essa razão, as bases nitrogenadas podem parrear-se em posições alteradas. O acúmulo de bases danificadas, pode assim, resultar em oncogênese. Em enzimas, as alterações nos aminoácidos tendem a resultar em alterações de estrutura e conseqüentemente da função enzimática. As membranas celulares também são alvos dessas espécies reativas e a oxidação dos lipídeos pode afetar o transporte seletivo nessas estruturas, bem como levar ao seu rompimento, provocando morte celular (BARREIROS, 2006).

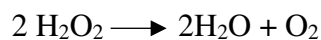
Entre as espécies reativas do oxigênio, destaca-se o oxigênio siglete (1O_2), forma molecular do oxigênio (O_2), mas altamente reativo. Além deste, radicais superóxidos ou ânions superóxidos (O_2^-), ânion peróxido (O_2^{2-}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e os radicais hidroxila (OH^*) fazem parte deste grupo e são altamente prejudiciais às células em elevadas concentrações (TORTORA et al., 2012).

Os radicais superóxidos ou ânions superóxidos (O_2^-) são formados naturalmente nos organismos que utilizam oxigênio como receptor final de elétrons durante a respiração celular, são extremamente tóxicos e produzem um efeito de reação em cadeia a medida em que sequestram elétrons de moléculas vizinhas. Como mecanismo de neutralização dos radicais

superóxidos, os organismos produzem a enzima superóxido-dismutase (SOD), que converte o oxigênio molecular em água e peróxido de hidrogênio:



No entanto, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produzido nessa reação, contém o ânion peróxido (O_2^{2-}), também tóxico, razão pela qual outras enzimas neutralizantes dessas moléculas, como a catalase, convertem o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (TORTORA et al., 2012):



O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pode ser considerado um potencial agente oxidante, visto que possui um tempo de meia vida longo, permitindo que sua permanência no ambiente celular seja maior, podendo assim, chegar ao núcleo da célula e causar danos ao DNA (SAEED-ZIDANE et al., 2017). Além disso, ele atravessa a membrana da célula devido a sua propriedade apolar e no citoplasma é convertido em OH^- . Esse ânion formado, em razão da sua reatividade pode provocar reações de oxido-redução e resultar em alterações nas células (ROCHA, 2017). Outra espécie reativa, o radical hidroxila (OH^\cdot), e talvez a forma mais reativa do oxigênio, é produzido no citoplasma celular e é altamente prejudicial às células (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). A alta nocividade do OH^\cdot às células está relacionada principalmente ao tempo de meia vida muito curto dessa entidade química, fazendo com que a ação dessa espécie reativa ocorra de modo mais rápido que ação dos agentes antioxidantes (SAEED-ZIDANE et al., 2017).

Apesar de tóxicas, essas formas reativas de oxigênio fazem parte do maquinário de defesa do organismo e estão relacionadas com uma série de processos celulares importantes, entre os quais estão: produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas (BARREIROS et al., 2006). Durante o processo ovulatório, são importantes por facilitarem o rompimento folicular no momento da ovulação. Quando ocorre o pico de LH antes da ovulação, células inflamatórias são direcionadas ao local da ruptura folicular, onde passam a produzir espécies reativas que irão provocar inflamação no local e facilitar a liberação do oócito pronto para ser fertilizado (SOHEL et al., 2017). No entanto, a produção excessiva de radicais livres no organismo, como resultado da deficiência do sistema antioxidante natural é responsável pelo efeito prejudicial dessas espécies. Como resultado da produção exacerbada de espécies reativas, ocorre

peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA, estando esses fenômenos associados a diversos quadros patológicos, incluindo artrite, doenças do coração, câncer e AIDS (VASCONCELOS et al., 2007).

Nesse contexto, os antioxidantes, são responsáveis por regular a ação dos radicais livres no organismo (RIBEIRO, 2016). Assim, nas últimas décadas o estudo acerca dos efeitos deletérios das espécies reativas estimulou o interesse e o uso dos antioxidantes como ferramentas para prevenção de diversas patologias ocasionadas pela ação dos radicais livres (FANG; YANG; WO, 2002).

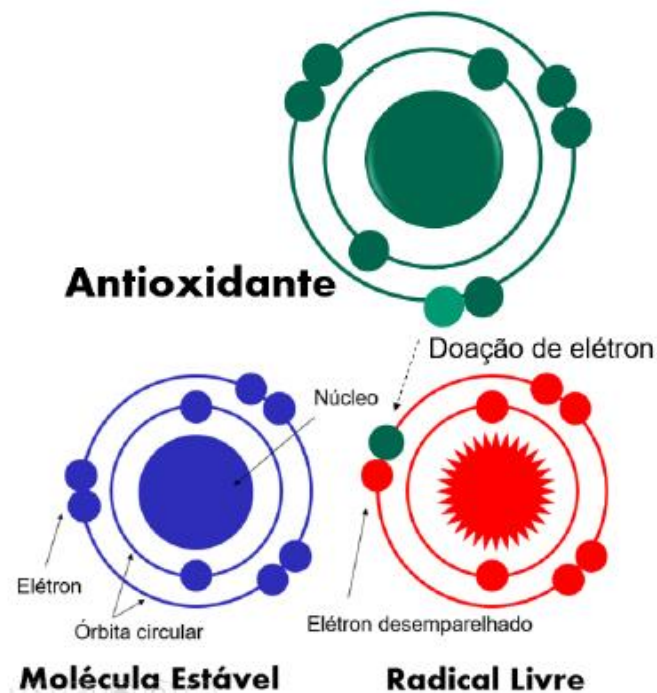
2.5 Mecanismos de ação dos agentes antioxidantes

Os antioxidantes abrangem diferentes classes de compostos e mecanismos de ação, e têm por função interferir no processo de oxidação com a finalidade de inibir ou retardar o dano oxidativo causado pelos radicais livres às biomoléculas, promovendo isso por meio da inativação ou estabilização desses radicais (Figura 5). Essa proteção ao estresse oxidativo pode ser realizada por um sistema enzimático ou não enzimático (HALLIWELL; CLEMENT; LONG, 2000).

O sistema enzimático conta com a ação das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (Se-Gpx), glutathione reductase (Gr), catalase e thioredoxina reductase (Trx). SOD, Se-Gpx, Catalase e Gr atuam mantendo os níveis de EROs fisiologicamente adequados ao funcionamento celular, enquanto Trx atua regulando os níveis de moléculas alvo oxidadas. O sistema não enzimático, por sua vez, conta com uma variedade de compostos que podem ser adquiridos principalmente de fontes exógenas, dentre os quais, os compostos lipofílicos e hidrofílicos protegem os compartimentos polares e apolares do organismo. Entre as principais classes de compostos com atividade antioxidante estão: vitaminas (vitamina C e vitamina E), carotenóides (carotenos e xantofilas) e polifenóis (flavonoides, flavonóis, flavonas, flavanonas, antocianinas, isoflavonas, ácidos fenólicos, taninos, estilbenos e lignanas) (OROIAN; ESCRICHE, 2015; SOUSA et al., 2007; RIBEIRO et al., 2005).

Os antioxidantes produzem radicais não reativos e, portanto, não são capazes de propagar a reação em cadeia causada pelas espécies reativas. Os radicais não reativos podem ser neutralizados através de reação com outro radical, produzindo desta forma, produtos estáveis ou podem ainda sofrer reciclagem por outro antioxidante (SOUSA et al., 2007).

Figura 5: Esquema ilustrativo da ação de um antioxidante agindo na estabilização de um radical livre por meio da doação de um elétron.



Fonte: Mattos (2019).

Apesar dos efeitos benéficos, o crescente uso de antioxidantes sintéticos utilizados principalmente na indústria alimentícia como hidroxitolueno butilato (BHT), hidroxilanol butilado (BHA), têm promovido discussões acerca dos efeitos adversos provocados por essas substâncias, principalmente sobre o seu potencial carcinogênico. Com isso, o interesse na utilização de recursos naturais como fonte de antioxidantes não prejudiciais à saúde, a exemplo daqueles obtidos de extratos de plantas, resultou em diversos estudos sobre potencial antioxidante de espécies vegetais (CALEJA et al., 2016; AQUINO et al., 2017).

Liu et al. (2015) afirmaram que extratos de plantas contendo elevada abundância de polifenóis, a exemplo do extrato de alecrim e de folhas de bambu, foram considerados aditivos alimentares mais seguros que o hidroxianisol butilado (BHA) e hidroxitolueno butilado (BHT). Além disso, estudos utilizando a aplicação de antioxidantes de origem vegetal em ensaios *in vitro* têm mostrado a eficiência dessas substâncias, como demonstrou Rocha (2017) por meio da utilização do resveratrol como antioxidante durante vitrificação de tecido ovariano bovino. Nesse estudo, o resveratrol possibilitou uma menor produção de EROs e maior viabilidade tecidual após vitrificação.

2.6 Papel das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPX1 e PRDX6

Mecanismos antioxidantes existem em todos os organismos, permitindo-os lidar com ambientes oxidativos e ajudar as células a reparar os danos causados pela EROs. Entre as principais enzimas que participam da defesa antioxidante do organismo estão CAT, SOD, GPX1 e PRDX6 (WANG et al., 2017).

SOD, CAT e GPX são os três antioxidantes enzimáticos mais comuns e atuam desempenhando papéis críticos na remoção dos produtos nocivos de oxigênio produzidos pela superóxido dismutase (FRIDOVICH, 1995). A glutathione (GSH) é considerada o principal representante dos antioxidantes não enzimáticos presentes em oócitos e embriões (BEHRMAN et al., 2001).

Existem três diferentes tipos de superóxido dismutase que diferem entre si na natureza do centro ativo do metal, composição de aminoácidos, co-fatores e outras características. As diferentes isoformas de SOD são conhecidas como Zn-SOD, Mn-SOD mitocondrial e SOD extracelular. A superóxido dismutase atua neutralizando os íons superóxido, passando por sucessivos ciclos oxidativos e redutores de íons de metais de transição em seu local ativo. Essa enzima possui duas subunidades semelhantes e cada uma delas inclui como local ativo, um aglomerado de metal dinuclear constituído por íons cobre e zinco, e catalisa especificamente a dismutação do ânion superóxido para oxigênio e água (SHENG et al., 2014).

A catalase desempenha função importante no metabolismo de EROs e é encontrada de forma predominante nos peroxissomos. Em oócitos foi verificado que a expressão de catalase é baixa quando comparado às outras células foliculares (PARK et al., 2016; HARVEY et al., 1995). Entre as funções desempenhadas pela CAT, sabe-se que caso haja inibição de CAT no núcleo oocitário podem ocorrer defeitos cromossômicos, como desalinhamento cromossômico, podendo ainda ocorrer danos ao DNA. Durante a maturação meiótica em oócitos de camundongo, foi observado que a catalase protege o genoma de danos oxidativos (PARK et al., 2016).

Quanto à peroxiredoxina 6 (Prdx6, 1-cys peroxiredoxin) sabe-se que se trata de um membro exclusivo da família das peroxiredoxinas, sendo a única peroxiredoxina que possui capacidade de reduzir os hidroperóxidos fosfolipídicos por meio de sua atividade de glutathione peroxidase (Gpx). Além de sua já conhecida atividade de peroxidase, a Prdx6 também desempenha atividade de fosfolipase A₂ independente de cálcio e ácido (aiPLA₂) e atividades de lisofosfatidilcolina acil transferase (LPCAT) em locais catalíticos separados. Estudos demonstraram que Prdx6 desempenha papéis cruciais no metabolismo dos fosfolipídios

pulmonares, promovendo o reparo da peroxidação lipídica e na sinalização inflamatória (AREVALO; VÁZQUEZ-MEDINA, 2018).

No que diz respeito à Glutathione peroxidase, trata-se de uma enzima com função antioxidante, contendo selênio. Ela protege as células contra o estresse oxidativo, eliminando o peróxido de hidrogênio e os hidroperóxidos orgânicos, que são equivalentes redutores do NADPH por meio do sistema glutathione-glutathione reductase (FLOHE; TOPPO; COZZA, 2011).

2.7 Óleos essenciais como fontes de compostos antioxidantes

Os óleos essenciais são misturas de compostos voláteis que podem ser obtidos a partir de plantas. São caracterizados por possuírem uma ampla variedade de compostos bioativos, razão pela qual têm atraído interesse no seu uso para diversas finalidades, incluindo ação antibacteriana, anticancerígena, anti-inflamatória, antifúngica e antioxidante (CARNEIRO et al., 2017).

Os componentes químicos desses óleos voláteis possuem natureza variada e podem apresentar diferenças tanto entre espécies, quanto entre as partes de uma mesma planta (MIRANDA et al., 2016). Os principais constituintes dos óleos essenciais são terpenos e fenilpropanoides, sendo que os primeiros, com base na diversidade de sua estrutura química, podem ser classificados em vários grupos como: monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos (AKTHAR; DEGAGA, AZAM, 2014). Além disso, a presença de outros metabólitos secundários está relacionada com o alto potencial antioxidante dos óleos essenciais, principalmente devido a presença de compostos fenólicos e seus derivados, os quais estão intimamente relacionados com a eliminação de radicais livres, especialmente devido à presença de grupos hidroxila nas suas estruturas, tornando-os potenciais agentes redutores através da doação de hidrogênios (AQUINO et al., 2017; GHAFARI et al., 2018). Os compostos fenólicos englobam uma variedade de substâncias, entre elas, os ácidos fenólicos, que são caracterizados por possuírem em sua estrutura um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, responsáveis pelas suas propriedades antioxidantes (SOARES, 2002).

Diante da diversidade de aplicabilidade desses compostos bioativos, diversos estudos direcionados à análise da atividade terapêutica de plantas utilizadas na medicina natural, incluindo a investigação do potencial terapêutico de extratos das espécies do gênero *ocimum* têm sido realizados (MORAIS et al., 2006).

O gênero *ocimum* pertence à família Labiatae e possui cerca de 50 a 150 espécies de árvores e arbustos, que são utilizadas amplamente na medicina natural. Nos óleos essenciais dessas plantas, foram identificados diversos compostos fenólicos, incluindo flavonoides, diterpenos fenólicos e ácidos fenólicos, os quais apresentam elevado efeito antioxidante (JAVANMARDI et al., 2003).

Entre as espécies do gênero *Ocimum* encontra-se o manjericão (*Ocimum basilicum* L.), presente em regiões tropicais e subtropicais do mundo (KHAKDAN et al., 2016). Análises demonstraram que os compostos fenólicos presentes no manjericão são responsáveis pela sua ação antioxidante e podem ser encontrados em ácidos fenólicos, como o ácido rosmarínico, um derivado do ácido caféico (AGUIYI et al., 2000; MELO et al., 2006), que apresenta diversos efeitos farmacológicos, incluindo ação antioxidante, antiviral e anti-inflamatória (SWARUP et al., 2007; MEHNI; SHARIFIFAR; ANSARI, 2012).

Arranz et al. (2015) demonstraram que o óleo bruto de manjericão apresenta elevado potencial para utilização como um antioxidante natural em produtos alimentícios, sensíveis à oxidação lipídica, ou mesmo alimentos orgânicos. Kapewangolo et al. (2015) mostraram o potencial antioxidante e anti-inflamatório de *Ocimum labiatum*, encorajando o uso desse componente como uma fonte suplementar às terapias anti-inflamatórias e antioxidantes. Além disso, Fathiazad et al. (2012) relataram em seu estudo que os efeitos cardioprotetores de *Ocimum* podem estar correlacionados com os seus compostos antioxidantes.

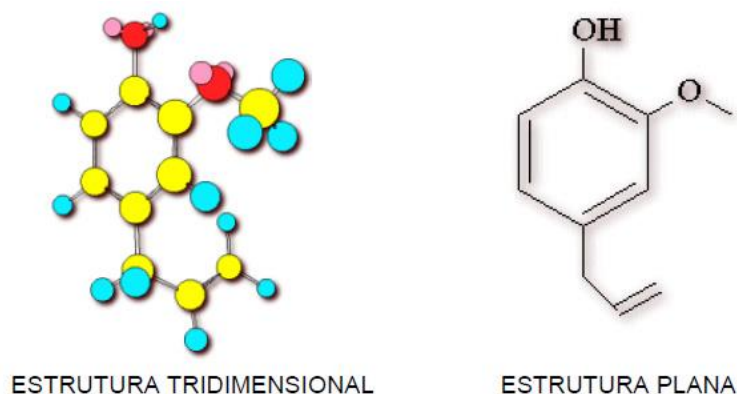
A ação antioxidante relatada para os óleos essenciais de espécies do gênero *ocimum* pode estar relacionada principalmente aos compostos químicos presentes na sua composição, entre os quais destacam-se o estragol, α -bergamoteno, linalol e eugenol (ARRANZ et al., 2015; LI et al., 2017). Anand et al. (2016) foram capazes de detectar a presença do Eugenol como componente químico em diversas espécies de *Ocimum*. No óleo essencial de *O. gratissimum* foi verificado que o eugenol é um dos principais componentes químicos, sendo este, normalmente encontrado como componente majoritário, e responsável por diversas ações biológicas do óleo essencial dessa espécie (PAULA-FREIRE et al., 2015). Em análise dos constituintes químicos presentes no óleo essencial de *O. gratissimum*, Barbosa et al. (2016) registraram a presença majoritária do eugenol, seguido da presença de 1,8-cineol, β -selineno e E-cariofileno. Ainda nesta pesquisa, foi verificado que o óleo essencial de *Ocimum gratissimum* apresentou teor de eugenol de 47,03%, resultado semelhante ao observado no estudo de Vieira e Simon (2000), em que o teor encontrado foi de 40 a 66%.

2.8 Caracterização química e atividade antioxidante do Eugenol

Evidências apontam que os antioxidantes naturais, possuindo pelo menos uma estrutura fenólica em sua composição, exercem funções importantes na proteção dos tecidos contra os danos provocados pelos radicais livres. O eugenol (4-alil-2 metoxifenol) (Figura 6), faz parte desses compostos fenólicos de ocorrência natural (NAGABABU et al., 2011), sendo um fenol fenilpropanóide aromático presente em diversos grupos vegetais, incluindo cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, Myrtaceae) e manjerição (*Ocimum basilicum*, Lamiaceae). Os fenilpropanóides são compostos com um anel fenílico e uma cadeia lateral de propenilo (ALVES et al., 2017).

A síntese biológica do eugenol ocorre a partir do aminoácido fenilalanina, através da rota metabólica dos fenilpropanóides, pela via chiquinato, fenilalanina e ácido unâmico (SENANAYAKE, 1977). Esse composto possui duplo efeito em condições de estresse oxidativo, podendo agir como antioxidante ou pró-oxidante. Além disso, outras propriedades, como sua ação anticancerígena, citotóxica e antitumoral já foram registradas (BEZERRA et al., 2017).

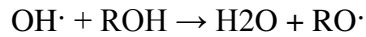
Figura 6 – Esquema ilustrativo da estrutura tridimensional e plana da molécula de Eugenol.



Fonte: Linard (2008).

Os compostos ricos em grupos fenólicos são reconhecidos por exibirem propriedades antioxidantes e eliminarem espécies de radicais livres através da doação de um átomo de hidrogênio. Durante esse processo, o grupo fenólico antioxidante é convertido em uma espécie de radical fenoxila considerado mais estável em razão da deslocalização de elétrons em seus anéis de benzeno adjacentes ou dimerização. Dessa forma, o radical fenoxil é considerado menos prejudicial e não apresenta reatividade com muitas moléculas de substrato.

Por esse motivo, a propriedade antioxidante do grupo fenólico é dependente da facilidade com que esse grupo pode perder elétrons durante a eliminação de um radical (NAGABABU et al., 2011).



(OH = radical hidroxilo, ROH = composto fenólico).

Estudos mostraram que o Eugenol reduziu a oxidação proteica *in vivo* induzida por LPS melhorando os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes e evitando danos à estrutura pulmonar de ratos (MAGALHÃES et al., 2018). Além disso, ele foi capaz de inibir a peroxidação lipídica iniciada pelo radical $\cdot\text{OH}$ com valores de IC_{50} de 10 μM e 14 μM . Foi demonstrado ainda que a capacidade do eugenol em inibir espécies reativas é cerca de 5 vezes maior que do α -tocoferol (NAGABABU; LAKSHMAIAH, 1992; NAGABABU; LAKSHMAIAH, 1994). Slamenova et al., (2009) mostraram que o Eugenol apresentou atividade antioxidante em células Hep-G2, Caco-2 e VH10 derivadas de humanos nas concentrações de 5, 10, 50 e 100 μM .

A análise da atividade antioxidante de compostos relacionados quimicamente ao Eugenol, demonstrou que esses compostos podem exercer atividade antioxidante e anti-inflamatória em células RAW264.7 estimuladas por LPS, agindo possivelmente pela inibição da ativação do fator nuclear kappa B (Nf-B). Esses resultados mostram-se relevantes uma vez que as condições de estresse oxidativo podem promover citotoxicidade, apoptose e atividade inflamatória nas células (MURAKAMI; KAWATA; FUJISAWA, 2017). Por ser uma substância lipofílica, o eugenol é rapidamente absorvido e tem a capacidade de penetrar as membranas biológicas e atingir alvos intracelulares (LINARD, 2008).

3. JUSTIFICATIVA

A biotecnologia reprodutiva continua tendo como alvo de estudo a expansão da disponibilidade de gametas femininos. Apesar dos avanços das biotécnicas de reprodução assistida, o número de oócitos de folículos pré-antrais aptos a maturação *in vitro*, ainda é limitado, mesmo com um grande grupo de gametas presentes nos ovários mamíferos e potencialmente capazes de produzir nascidos vivos (BARBONI et al., 2011). Na espécie bovina, a produção de oócitos competentes à fase de fertilização *in vitro* ainda é pequena, principalmente devido a não elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na foliculogênese, sendo esta uma das principais questões relacionadas à biologia ovariana (ARAÚJO et al., 2014; BARBONI et al., 2011; SILVA et al., 2016). Enquanto em outras espécies tem sido relatada a produção de embriões após cultivo *in vitro*, em bovinos, os resultados obtidos têm sido limitados à ativação de folículos primordiais e formação de folículos antrais a partir de pré-antrais (secundários) (ARAÚJO et al., 2014).

Diante disso, é de fundamental importância o desenvolvimento de sistemas de cultivo *in vitro* que sejam capazes de suportar o crescimento folicular, mantendo as interações celulares necessárias para o desenvolvimento de folículos em espécies com crescimento folicular prolongado, como em bovinos (ARAÚJO et al., 2014; MCLAUGHLIN et al., 2010). Outro desafio relacionado ao cultivo *in vitro* de folículos ovarianos relaciona-se ao fato de que as condições de cultivo *in vitro* podem favorecer o estresse oxidativo e diminuir a proteção antioxidante das células (LINS et al., 2017; AGARWAL et al., 2012). Por esse motivo, diversas substâncias com ação antioxidante têm sido utilizadas nos meios de cultivo com a finalidade de evitar a formação de EROs. Recentemente tem sido proposto a utilização de antioxidantes de origem vegetal com essa finalidade (LINS et al., 2017).

Entre essas substâncias destacam-se os óleos essenciais, que entre suas diversas atividades biológicas comprovadas, apresentam elevado potencial antioxidante (CARNEIRO et al., 2017). Os extratos de espécies do gênero *ocimum*, incluindo seus óleos essenciais têm sido citados em diversos estudos como poderosos agentes bioativos. Hailong et al. (2016) verificaram ação antioxidante em espécies deste gênero. Os resultados obtidos por Béric et al. (2008) indicaram que o potencial antígeno-tóxico observado em derivados de *Ocimum basilicum*, inclusive seu óleo essencial, pode ser atribuído às suas propriedades antioxidantes. Além disso, Srivastava et al. (2015) sugeriram que *O. basilicum* poderia ser recomendado para o tratamento de infecções provocadas por patógenos bacterianos, representando uma fonte potencial de antioxidantes naturais com considerável quantidade de conteúdo fenólico total.

No que diz respeito aos óleos essenciais da espécie *O. gratissimum*, Trevisan et al. (2006) correlacionaram sua capacidade antioxidante à presença em alta proporção de compostos que possuem um anel fenólico, como o eugenol. O eugenol, por ser um dos principais constituintes do óleo essencial de *ocimum gratissimum* tem sido relatado em diversos estudos como responsável pela sua ação antioxidante, e, em sinergia com outro constituinte químico deste óleo, o *E*-cariofileno, pode potencializar a ação antioxidante do óleo essencial (BARBOSA et al., 2016).

Diante disso, acredita-se que o óleo essencial de *Ocimum gratissimum* e o Eugenol possam ser utilizados como antioxidantes para a suplementação dos meios de cultivo de folículos ovarianos pré-antrais bovinos, com a finalidade de promover o crescimento e formação de antro, bem como a manutenção da viabilidade e morfologia folicular durante o período de cultivo *in vitro*.

4. HIPÓTESES

A adição de Eugenol e do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* ao meio de cultivo influencia positivamente o crescimento e a manutenção da morfologia e viabilidade de folículos secundários bovinos cultivados *in vitro*.

A adição de Eugenol e do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* ao meio de cultivo aumenta a porcentagem de formação de antro durante o cultivo *in vitro* de folículos secundários bovinos.

A adição de Eugenol e do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* ao meio de cultivo aumenta os níveis de RNAs mensageiros para *SOD*, *CAT*, *PRDX6* e *GPX1* em folículos secundários bovinos cultivados *in vitro*.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos de diferentes concentrações do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (0,125%, 0,25% ou 0,5%) e do Eugenol 5, 10 e 50 μM sobre a viabilidade e crescimento de folículos secundários bovinos cultivados *in vitro*.

5.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (0,125%, 0,25% ou 0,5%) e do Eugenol (5, 10 e 50 μM) sobre o crescimento e taxa de formação de antro de folículos secundários bovinos cultivados *in vitro* por 18 dias.
- Verificar, por meio de análise morfológica, o efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (0,125%, 0,25% ou 0,5%) e do Eugenol (5, 10 e 50 μM) sobre a viabilidade de folículos secundários bovinos após 18 dias de cultivo *in vitro*.
- Quantificar os níveis de RNA mensageiros para *SOD*, *CAT*, *GPX1* e *PRDX6* em folículos secundários bovinos cultivados na presença do eugenol e do óleo essencial de *O. gratissimum*.

ARTIGO 1

Effects of *Ocimum gratissimum* essential oil on *in vitro* growth and expression of mRNA for antioxidant enzymes in cultured bovine secondary follicles

***Ocimum gratissimum* essential oil (OGEO) increases the expression of mRNA for catalase (CAT) and peroxiredoxin 6 (PRDX-6) during in vitro culture of bovine secondary follicles**

OGEO increases the expression of CAT and PRDX 6 in bovine follicles

E.M. Vasconcelos^a; F. C. Costa^a; A. V. N. Azevedo^a; L. R. F. M. Paulino^a; M. D. Soares^a; A. L. P. Souza^a; V.A. Carneiro^b, J.E. Catunda Jr^c, J.R.V. Silva^a

^aLaboratory and Biotechnology and Physiology of Reproduction (LABIREP), Federal University of Ceara, Sobral, CE, Brazil. ^bCenter of Bioprospection and Experimentation Molecular Applied (NUBEM), University Center INTA–UNINTA, Sobral, Ceará. ^cCenter for Exact, Natural and Technological Sciences, State University of the Tocantina Region of Maranhão, Imperatriz, Maranhão

Corresponding author: J.R.V. Silva, Federal University of Ceara, Av. Comandante Mauricélio Rocha Ponte 100, CEP 62041 040, Sobral, CE, Brazil. Phone / Fax: +55 88 36118000

[jrvsilva@ufc.br]

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effects of different concentrations of *O. gratissimum* essential oil (OGEO) on growth, viability, antrum formation and mRNA expression of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and peroxiredoxin

6 (Prdx6) in bovine secondary follicles cultured in vitro. Bovine ovaries were collected at a local slaughterhouse and, in the laboratory; the secondary follicles were isolated from the ovarian cortex. The follicles were cultured in TCM-199⁺ alone or supplemented with different concentrations of OGEO (0.125, 0.25 and 0.5%). Follicle diameters and antrum formation were evaluated at days 0, 6, 12 and 18. At the end of culture, viability analysis was performed by using calcein and homodimer ethidium. Real time PCR was used to quantify the levels of mRNA for SOD, CAT, GPX1 and PRDX6 in follicles cultured in all treatments for 18 days. Follicular diameters and the levels of mRNA in follicles cultured in the different treatments were compared by ANOVA and Kruskal-Wallis test, while the percentages of follicle survival and antrum formation were compared by chi-square test ($P < 0.05$). The results showed that secondary follicles cultured in presence of OGEO kept their morphology, viability and growth similar to the control group. In addition, the presence of 0.5% or 0.25% of OGEO in culture medium significantly increased the levels of mRNAs for PRDX6 and CAT, respectively. In conclusion, OGEO increases the levels of mRNAs for PRDX6 and CAT in bovine secondary follicles cultured in vitro for 18 days and maintain their viability, morphology and growth.

Keywords: antioxidant, essential oil, follicles, bovine, *in vitro* culture.

1. Introduction

It is well known that of preantral follicles, i.e., primordial, primary and secondary follicles, represent approximately 90% of ovarian follicular population, but most of the, (~90%) became atretic during growth and maturation (Britt, 1991). Thus, isolation and in vitro culture of these follicles have been used in an attempt to obtain competent oocytes and also to study the effects of various factors, such as hormones, antioxidants, nutrients, vitamins, and local

factors during follicular development. Despite the birth of mice after *in-vitro* growth of primordial follicles and fertilization of their oocytes have been described (O'Brien et al., 2003), many researchers have been committed to develop similar strategies for domestic animals and endangered species, but the number of embryos produced from *in-vitro* grown preantral follicles is very low and no gestation was reported (Silva et al., 2016). It is important to consider that in bovine species, primordial follicles are activated and begin to grow at least 100 days before ovulation (Britt, 1991), which means that, *in vitro*, these follicles need to be cultured for long periods. However, *in vitro* culture of bovine preantral follicles for a period of 32 days (Araújo et al., 2015), and even for 32 weeks in human species (Fabri et al., 2012), resulted in oocytes that were able to assure early embryo development. In this sense, an optimization of *in vitro* culture systems for preantral follicles is still needed.

It has been reported that reactive oxygen species (ROS) are formed during *in vitro* culture and can cause cellular damage such as membrane lipid peroxidation, mitochondrial lesions and cell degeneration, resulting in low production of competent oocytes (Kashka et al., 2016). Culture media can contain a wide variety of substances, including hormones, vitamins, growth factors and antioxidants albumin, vitamins, buffers, and heavy metal chelators, that can be a source of ROS during handling and culture (Martin-Romero et al., 2002). Antioxidants play an essential role in eliminating ROS that are formed during *in vitro* culture, and equilibrium is required between ROS generation and antioxidants for the development of a competent oocytes. ROS generation is limited by anti-oxidant enzymes, such as superoxide dismutase (SOD), catalase, and peroxidases. The SOD promotes a dismutation of superoxide radicals to H_2O_2 , which is further detoxified to water and oxygen by catalase or glutathione peroxidase (GPx). Catalase is responsible for the conversion of H_2O_2 into water and oxygen, while GPx catalyzes the degradation of lipid peroxides, as well as H_2O_2 (Kala et al., 2016). Peroxiredoxin 6 (Prdx6) is another enzyme with the ability to bind and reduce phospholipid hydroperoxides

(Fisher, 2011). These enzymatic mechanisms regulate the ROS concentration, but, *in vitro*, many non-enzymatic antioxidant, such as ascorbic acid, vitamin E, selenium, transferrin, anethole and beta carotene, are ordinarily present in culture media (Santos et al., 2014, Farzollahi et al. 2016, Sá et al., 2018).

As an alternative to improve *in vitro* culture systems, essential oils (EOs) extracted from plants, especially with antioxidant capacity (Pereira & Maia, 2007), are important biotechnological products that can be used as supplements for culture media. *O. gratissimum L.*, or clove basil, belongs to the Lamiaceae family, and it is commonly found in Africa, Asia, and South America (Mohr et al., 2017). Melo et al. (2019) identified 19 compounds in *O. gratissimum L.* essential oil (OGEO), representing 99.42% of the constituents. The most abundant volatile components were eugenol (74.83%) and 1,8-cineole (15.16%), but several classes of chemical compounds were found, mainly phenylpropanoid (74.83%), oxygenated monoterpenes (16.09%), hydrocarbon sesquiterpenes (6.96%), and minor amounts of hydrocarbon monoterpenes (0.92%) and oxygenated sesquiterpenes (0.62%). Trevisan et al. (2006) demonstrated antioxidant capacity of EOs of different species of the genus *Ocimum* during *in vitro* tests. This antioxidant capacity was positively correlated with a high proportion of compounds possessing a phenolic ring such as eugenol. Joshi (2013) showed high antioxidant activity of *OGEO*, and its effect was attributed to the high eugenol content. *O. gratissimum* antioxidant activities were also reported by other authors (Prakash et al., 2010, Bhatt et al., 2019). In rats, *Ocimum sanctum* decreased liver damage and increased the activity of antioxidant enzymes, such as glutathione peroxidase (GPX), glutathione S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) (Ponnusam, et al., 2016). However, it is still not if the presence of *O. gratissimum L.* essential oil in culture medium influences the expression of mRNA antioxidant enzymes during *in vitro* culture of bovine preantral follicles.

The aim of this study was to evaluate the effects of different concentrations of the essential oil of *O. gratissimum* (0.125, 0.25 and 0.5%) on viability, growth, antrum formation and mRNA expression SOD, CAT, GPX1 and PRDX6 in bovine secondary follicles after 18 days of *in vitro* culture.

2. Material and methods

2.1 Chemicals

The culture media and other chemicals used in this study purchased by Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA), unless otherwise indicated.

2.2 Extraction of OGEO

Extraction of *O. gratissimum* L. was performed as described recently by Melo et al. (2019). In short, fresh leaves of *O. gratissimum* L. were collected in the morning at Alto da Pipira (5°26'4.07" S, 47°17'45.83" W), in the State of Maranhão, in the northeast region of Brazil. The fresh leaves of *O. gratissimum* were dried at room temperature for four days. Then, the dried material (76.84 g) was mixed with 2.5 L of distilled water and subjected to hydrodistillation in a Clevenger-type apparatus for 3 h to afford a pale yellow oil. The isolated oil, after drying over anhydrous sodium sulfate (Na₂SO₄) and filtration, was stored in sealed glass vials. The chemical composition of this essential oil was described by Melo et al. (2019)

2.3 Ovarian collection

Ovaries of multiparous cows (n =50) were collected from a local slaughterhouse in Sobral, Ceará, Brazil. Immediately after death, the ovaries were washed in 70% ethanol for

approximately 10 s, followed by two further washes in TCM-199 medium supplemented with penicillin (100 mg/ml) and streptomycin (100 mg/ml) and buffered with HEPES. Then, the ovaries were transported within 1 hour to the laboratory in TCM-199 at 4°C. This study was registered by the Committee of Ethics and Animal Welfare of the Federal University of Ceará.

2.4 Follicle isolation and in vitro culture

In the laboratory, the ovarian cortex was fragmented (1-2 mm) with a sterile scalpel blade and fragments of the ovarian tissue were placed in HEPES-buffered TCM-199 medium supplemented with penicillin (100 mg/ml) and streptomycin (100 mg/ml). Secondary follicles measuring 150 to 250µm in diameters were manually isolated from the ovarian cortex with the aid of 26 Gauge needles and using a stereomicroscope (SMZ 645 Nikon, Tokyo, Japan). After isolation, follicles containing a visible oocyte surrounded by granulosa cells, an intact basement membrane, and without the presence of an antral cavity were selected for culture. Then, follicles were individually cultured in 100 µl drops of culture medium in Petri dishes (60 × 15 mm; Corning, USA). The control medium, identified as TCM-199⁺, consisted of TCM-199, (pH 7.2-7.4) supplemented with 3.0 mg/ml bovine serum albumin (BSA), 100UI penicillin/streptomycin, 10 µg/ml insulin, 5.5 µg/ml transferrin and 5 ng/ml selenium (ITS), 50 µg/ml ascorbic, 100 ng/ml FSH, 2 mM glutamine and 2 mM hypoxanthine. The follicles were randomly distributed and cultured in TCM-199⁺ alone or supplemented with 0.125, 0.25 and 0.5% of *OGEO*. In each treatment, a number of approximately 60 follicles were cultured. Culture conditions consisted of 38.5°C with 5% CO₂ in air for 18 days. Every three days, 60 µl of medium was replaced with fresh medium. The percentage of follicles considered morphologically normal was evaluated on days 0, 6, 12 and 18 of culture. Follicles containing an opaque oocyte and granulosa cells were considered degenerated. For follicular diameter

evaluation, two perpendicular measurements were performed on normal follicles using an inverted microscope with Nis elements 2.4 software (Nikon, Nikon Instruments Inc., Japan).

2.5 Assessment of secondary follicles viability by fluorescence microscopy

After culture, secondary follicles (n = 20 / treatment) were incubated in 100 µl droplets of TCM-199 medium supplemented with 4 mM calcein AM and 2 mM homodimer ethidium - 1 (Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe, Germany) at 37°C for a period of 15 minutes. The follicles were then washed three times in TCM-199 medium and then examined under the fluorescence microscope (Nikon, Eclipse, TS 100, Japan). Oocytes and granulosa cells were considered viable if the cytoplasm were positively stained with calcein AM (green) and unviable if the chromatin was positively labeled with ethidium-1 homodimer (red) (Van den Hurk et al., 1998).

2.6 Expression of mRNA for SOD, CAT, PRDX6 and GPX1 in cultured follicles

To evaluate the levels of mRNA for SOD, CAT, PRDX6 and GPX1, normal follicles that have been cultured in each treatment were collected and then stored at -80°C until extraction of RNA. Total RNA extraction was performed using a Trizol® purification kit (Invitrogen, São Paulo, Brazil) in accordance with the manufacturer's instructions. Quantification of mRNA was performed using SYBR Green. PCR reactions were composed of 1µL cDNA as a template in 7.5 µL of SYBR Green Master Mix (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 5.5 µL of ultra-pure water, and 0.5 µM of each primer. The primers were designed to perform amplification of *SOD*, *CAT*, *PRDX6*, *GPX1* and *GAPDH* (Table 1). The specificity of each primer pair was confirmed by melting curve analysis of PCR products. The thermal cycling profile for the first round of PCR was initial denaturation and activation of the

polymerase for 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C, 30 s at 58°C, and 30 s at 72°C. The final extension was for 10 min at 72°C. All reactions were performed in a Step One Plus instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The $\Delta\Delta C_t$ method was used to transform the C_t values into normalized relative expression levels (Livak and Schmittgen, 2001).

Table 1 - Primer pairs used for real-time PCR.

Target gene	Primer sequence (5' → 3')	Sense (S), anti-sense (As)	GenBank accession no.
<i>GAPDH</i>	TGTTTGTGATGGGCGTGAACCA ATGGCGCGTGGACAGTGGTCATAA	S As	GI: 402744670
<i>PRDX6</i>	GCACCTCCTCTTACTTCCCG GATGCGGCCGATGGTAGTAT	S As	GI: 59858298
<i>GPXI</i>	AACGTAGCATCGCTCTGAGG GATGCCCAAACCTGGTTGCAG	S As	GI:156602645
<i>SOD</i>	GTGAACAACCTCAACGTCGC GGGTTCTCCACCACCGTTAG	S As	GI: 31341527
<i>CAT</i>	AAGTTCTGCATCGCCACTCA GGGGCCCTACTGTCAGACTA	S As	GI:402693375

2.7 Statistical analysis

Data on follicular diameters were submitted to statistical analysis using the Kolmogorov-Smirnov and Bartlett test to assess normal distribution and homoscedasticity, respectively. These data were then evaluated by ANOVA. For comparisons of follicular diameters and levels of mRNA between treatments, the Kruskal-Wallis test (Graphpad Prism software, version 5.0) was used. Percentages of follicles with different daily growth rate, follicular survival and antrum formation data after *in vitro* culture within each treatment were compared by the chi-square test, with results being expressed as percentages. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Effects of *O. gratissimum* essential oil on follicular growth, antrum formation and viability

A progressive increase in follicular diameter was observed up to 18 days of *in vitro* culture. Table 2 shows significant follicles growth during 18 days in all treatments, inclusive in the control group. The only exception was for secondary follicles cultured in medium supplemented with 0.5% of *OGEO*, which had significant growth until day 12, but not after 18 days. When comparisons were made between treatments, no significant difference was observed growth. No effect of *OGEO* on follicular daily growth rate was observed (Tables 2).

Table 2. Diameters and daily growth rate (mean \pm SD) of bovine secondary follicles after 0, 6, 12 and 18 days of *in vitro* culture in TCM-199⁺ alone or supplemented with 0.125, 0.25 or 0.5% of *OGEO*.

	Day 0	Day 6	Day 12	Day 18	Daily growth
TCM-199⁺	244.4 \pm 7.2 ^a	302.5 \pm 8.3 ^b	318.6 \pm 10.6 ^c	343.6 \pm 14.4 ^d	5.76 \pm 3.84
OGEO 0.125%	233.2 \pm 6.3 ^a	288.6 \pm 9.6 ^b	314.2 \pm 12.1 ^c	332.1 \pm 13.7 ^d	5.78 \pm 4.64
OGEO 0.25%	237.3 \pm 7.1 ^a	292.7 \pm 7.8 ^b	311.0 \pm 10.8 ^c	331.2 \pm 13.9 ^d	4.78 \pm 3.36
OGEO 0.5%	221.8 \pm 5.3 ^a	276.0 \pm 6.6 ^b	299.6 \pm 11.0 ^c	308.4 \pm 12.0 ^c	4.66 \pm 3.69

a, b, c, d Lower case letters represent statistically significant differences between days of culture for each treatment (between columns)

Table 3 shows the percentage of normal follicles and antrum formation after 18 days of culture in control medium alone or supplemented with different concentrations of the *OGEO*. The great majority of the follicles remained viable after culture in all treatments, but no significant differences were observed among them. No differences were also observed in the percentage of antrum formation after follicle culture in the different treatments.

Table 3. Percentage of morphologically normal secondary follicles and of antrum formation after 18 days of *in vitro* culture in TCM-199+ alone or supplemented with 0.125, 0.25 or 0.5% of OGEO.

%	TCM-199+	OGEO 0.125%	OGEO 0.25%	OGEO 0.5%
Morphologically				
normal follicles	94.7% (54/57)	98.3% (58/59)	96.9% (63/65)	88.3% (53/60)
Antrum				
formation	16.6% (9/54)	10.3% (6/58)	14.3% (9/63)	15.1% (8/53)

3.2 Effects of OGEO on follicular viability

Fluorescence microscopy analysis showed that, after 18 days of culture in control medium alone or supplemented with 0.125%, 0.25% and 0.5% of the essential oil of *O. Gratissimum*, all follicles previously considered morphologically normal by light microscopy were viable, since they stained positively for calcein-AM, but not for ethidium homodimer. (Figure 1).

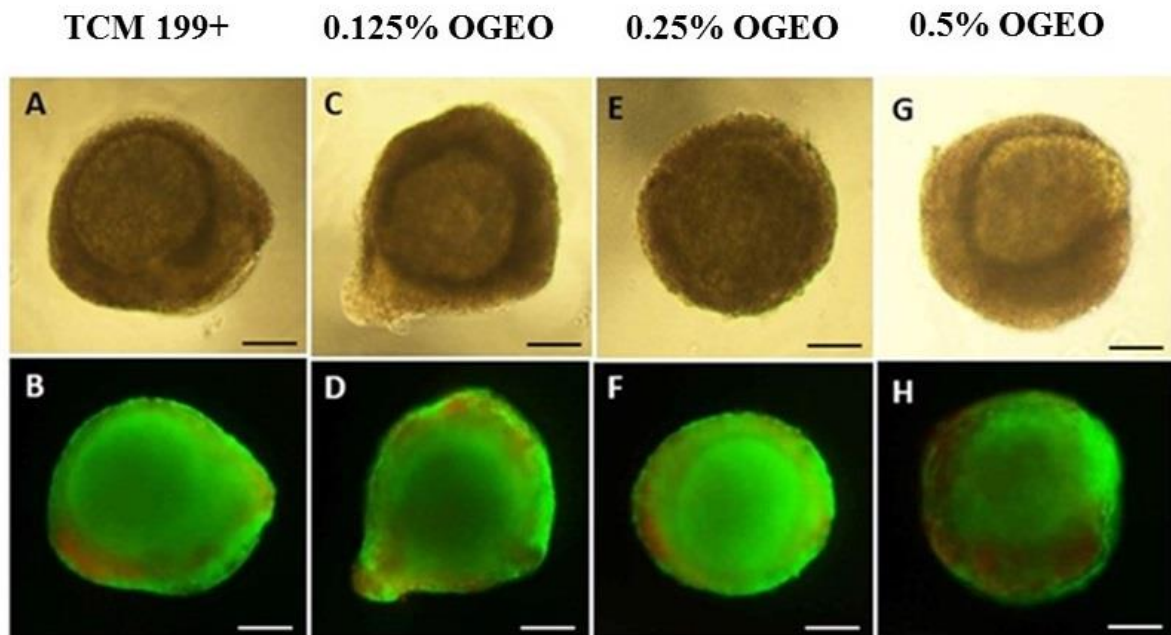


Figure 1. Viable bovine secondary follicles cultured for 18 days after staining with calcein-AM (green) and ethidium homodimer-1 (red). (A, B) Secondary follicle cultured in TCM 199+ (control). (C, D) Secondary follicle cultured in medium containing 0.5% OGEO. (E, F) Secondary follicle cultured in medium containing 0.25% OGEO. (G, H) Secondary follicle cultured in medium containing 0.125% OGEO. Bars = 50 μ m

3.3 Expression of mRNA for SOD, CAT, PRDX6 and GPXI in cultured follicles

The levels of mRNA for SOD, CAT, PRDX6 and GPXI in bovine secondary follicles after 18 days of culture are shown in Figure. 2. The presence of *OGEO* did not influence the levels of mRNA for *SOD* and *GPXI*, when compared to the control medium. However, when compared to the control medium, higher levels of *CAT* and *PRDX6* were observed in follicles cultured in the presence of 0.25 and 0.5% *OGEO*, respectively. In addition, the presence of 0.25% *OGEO* significantly increased mRNA levels for *CAT* when compared to those follicles cultured in medium supplemented with 0.5 or 0.125% *OGEO* ($P < 0.05$).

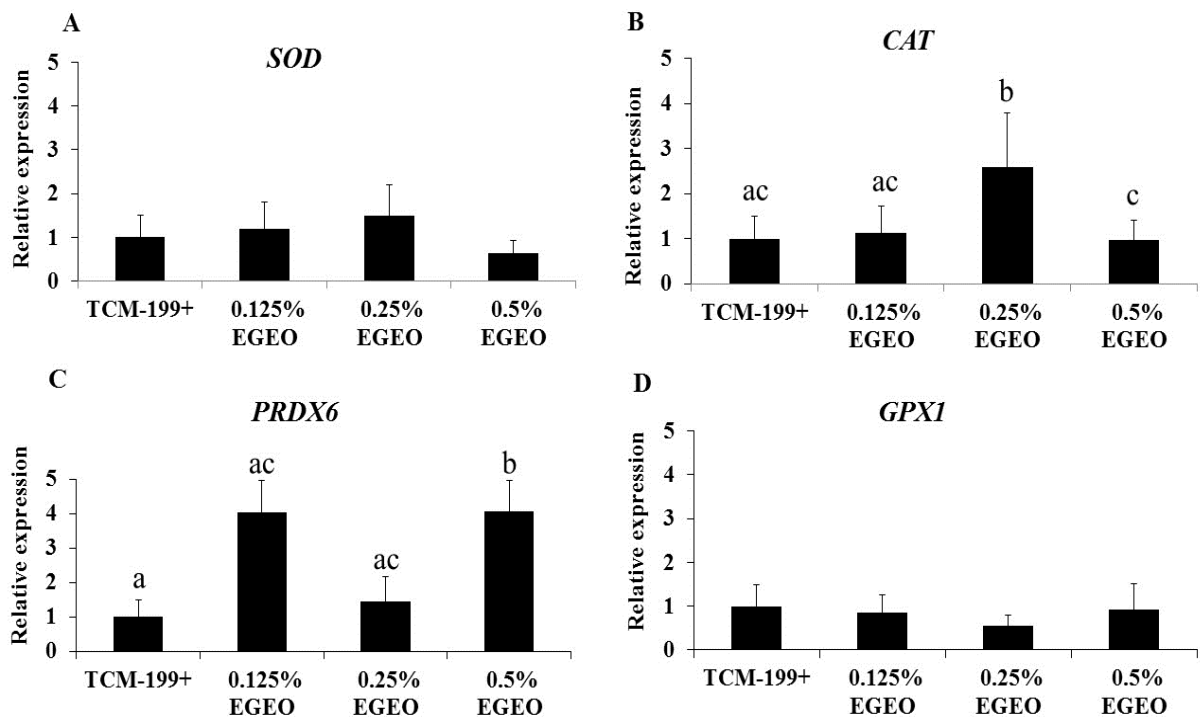


Figure 2. Levels of mRNA (means \pm SD) for (A) *SOD*, (B) *CAT*, (C) *PRDX6* and (D) *GPXI* in secondary follicles cultured *in vitro* for 18 days in TCM 199⁺ alone or supplemented with 0.5, 0.25 or 0.125% of *OGEO*. ^{abc} Represent significant differences between treatments ($P < 0.05$).

4. Discussion

This study shows for the first time that *OGEO* increases the levels of mRNAs for *PRDX6* and *CAT* in bovine secondary follicles cultured *in vitro* for 18 days. Increasing in the

expression of these can be very important for oocyte growth and acquisition of competency, since previous works have demonstrated that the expression of mRNA and protein for PRDX6 is upregulated in bovine oocytes and cumulus cells during in vitro maturation (Leyens et al., 2004ab). These authors also reported that PRDX6 transcripts are stored in the oocyte for later use in early embryos. PRDX6 peroxide reductase activity is involved in the control of hydrogen peroxides levels in COC and early embryos (Harvey et al., 2002). PRDX6 can also use the glutathione accumulated both in the oocyte and cumulus cells during maturation to reduce its oxidized form during the peroxidation process (de Matos et al. 1997). Prdx6 is the only peroxiredoxin capable of reducing phospholipid hydroperoxides through its glutathione peroxidase (Gpx) activity. In addition to its peroxidase activity, Prdx6 expresses acidic calcium-independent phospholipase A2 and lysophosphatidylcholine acyl transferase activities in separate catalytic sites (Arevalo & Vázquez-Medina, 2018). Phospholipase A2 activity in cumulus cells is linked to the production of arachidonic acid for the production of prostaglandins, involved in oocyte maturation process (Elvin et al., 2000; Calder et al., 2001). Reduction of lipid peroxidation in the oocyte is very important, since the products of this process, such as malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal (4HNE) have traditionally been viewed as toxic substances (Galleli et al. 2018).

Regarding the increased levels of CAT mRNA in bovine secondary follicles cultured in presence of *OGEO*, previous studies also demonstrated that polyphenol rich extract of *O. gratissimum* elevates the activities of CAT in colon mucosa and that *O. gratissimum* has the ability to deplete ROS levels and attenuate oxidative (Alabi et al., 2018). Park et al. (2016) showed that CAT is expressed in mouse oocytes and it is required for ROS scavenging, protecting the genome from oxidative damage during meiotic maturation. Recently, Yang et al. (2020) showed that increased levels of CAT mRNA in porcine oocytes is associated with decreased intracellular levels of ROS. CAT dismutates H_2O_2 to H_2O and molecular oxygen

(O₂), thereby providing protection against reactive oxygen species (ROS). Decreasing CAT levels can, however, increase H₂O₂ to produce the hydroxyl radical (OH[•]), which is extremely harmful to cells (Alabi et al., 2018).

Other enzymes involved in antioxidant defense, such as SOD and GPX1, were evaluated in this study, but their expression was not influenced by *OGEO*. Anti-oxidant defense systems, like SOD and GPx are present in bovine oocytes and cumulus cells to regulate the ROS levels during IVM (Cetica et al., 2001). The SOD causes a dismutation of superoxide radicals to H₂O₂, which is further detoxified to water and oxygen by catalase or glutathione peroxidase (GPx). GPx catalyzes the degradation of lipid peroxides, as well as H₂O₂. These mechanisms regulate the ROS concentration in the reproductive tract, thus ensuring normal functions (Kala et al., 2016). Kala & Nivsarkar (2016) described a correlation between increased mRNA expression of SOD subtypes and a decreased quality of matured oocytes that resulted in anovulation in mice. This indicates that an equilibrium of these protective mechanisms is very important for oocyte development and maturation.

This study showed that bovine secondary follicles cultured in presence of *OGEO* kept their viability, morphology and growth. Similarly, Torres et al. (2018) reported that *O. gratissimum* extract maintained viability, morphology and kept the proliferation of human MCF-7 cells in vitro. Other studies also demonstrated a high antioxidant potential of *OGEO* (Ijeh et al., 2005, Pereira & Maia, 2007), which could explain their effect on maintaining some of the parameters evaluated in this study. However, it is important to note that follicles cultured in the presence of higher concentration of *OGEO* had their growth interrupted after 12 day of culture. This fact may be associated with the high concentration of Eugenol in *OGEO* (Melo et al., 2019). De Araujo Lopes et al. (2018) showed that, despite minimizing oxidative damage, Eugenol showed toxicity to human keratinocytes when used in higher concentrations. These data also highlights the equilibrium of these antioxidants is essential for oocyte development

and maturation. Considering that *OGEO* have a complex composition (Melo et al., 2019), the possibility of a synergistic action between their components cannot be excluded, even with those in low concentrations (Oliveira et al., 2016).

In conclusion, *OGEO* increases the levels of mRNAs for PRDX6 and CAT in bovine secondary follicles cultured in vitro for 18 days and maintain their viability, morphology and growth. This shows the potential of *OGEO* to be used as supplement of preantral follicles culture media.

Financial support

This research was supported by grants from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil, Grant N° 308737/2018-0). E.M. Vasconcelos is recipient of scholarship from CAPES, Brazil.

Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific work.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

References

- Araújo V.R., Gastal M.O., Wischral A., Figueiredo J.R., Gastal E.L. (2015). Long-term *in vitro* culture of bovine preantral follicles: Effect of base medium and medium replacement methods. *Animal Reproduction Science*, 161, 23-31. doi: 10.1016/j.anireprosci.2015.07.006.
- Alabi Q.K., Akomolafe R.O., Omole J.G., Adefisayo M.A., Ogundipe O.L., Aturamu A.5., Sanya J.O. (2018). Polyphenol-rich extract of *Ocimum gratissimum* leaves ameliorates colitis via attenuating colonic mucosa injury and regulating pro-inflammatory cytokines production and oxidative stress. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 103, 812-818. doi: 10.1016/j.biopha.2018.04.071.
- Arevalo J.A., Vázquez-Medina J.P. (2018). The Role of Peroxiredoxin 6 in Cell Signaling. *Antioxidants*, 24, 1-13. doi: 0.3390/antiox7120172
- Bhatt S., Bisht M., Tewari G., Pande C., Prakash O., Rana L. (2019) Evaluation of antioxidant potential and quality of volatile constituents of fresh and sun dried *Ocimum gratissimum*. *Journal of the Indian Chemical Society*, 96, 297-304.
- Britt, J.H. (1991). Impacts of early postpartum metabolism on follicular development and fertility. *The Bovine Practitioner Proceeding*, 24, 39-43.
- Calder M.D., Caveney A.N., Westhusin M.E., Watson A.J. (2001). Cyclooxygenase-2 and prostaglandin E₂(PGE₂) receptor messenger RNAs are affected by bovine oocyte maturation time and cumulus-oocyte complex quality, and PGE₂ induces moderate expansion of the bovine cumulus *in vitro*. *Biology of Reproduction*, 65, 135–140. doi: <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.1.135>

Cetica P.D., Pintos L.N., Dalvit G.C., Beconi M.T. (2001). Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte in vitro maturation. *IUBMB Life*, 51, 57–64. doi: <https://doi.org/10.1080/15216540119253>.

De Araújo Lopes A., Da Fonseca F.N., Rocha T.M., De Freitas L.B., Araújo E.V.O., Wong D.V.T., Lima Júnior R.C.P., Leal L.K.A.M. (2018). Eugenol as a Promising Molecule for the Treatment of Dermatitis: Antioxidant and Anti-inflammatory Activities and Its Nanoformulation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-13. doi: [10.1155/2018/8194849](https://doi.org/10.1155/2018/8194849)

De Matos D.G., Furnus C.C., Moses D.F. (1997). Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. *Biology of Reproduction*, 57, 1420–1425. doi: [10.1095/biolreprod57.6.1420](https://doi.org/10.1095/biolreprod57.6.1420)

Elvin J.A., Yan C., Matzuk M.M. (2000). Growth differentiation factor-9 stimulates progesterone synthesis in granulosa cells via a prostaglandin E2/EP2 receptor pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 10288–10293. doi: [10.1073/pnas.180295197](https://doi.org/10.1073/pnas.180295197)

Fabbri R., Pasquinelli G., Parazza I., Macciocca M., Magnani V., Battaglia C., Paradisi R., Venturoli S. (2012) Effects of cyclic increase in gonadotropins on the in vitro development of primordial follicles to antral stage. *Ultrastructural pathology*, 36, 356-361. doi: [10.3109/01913123.2012.679353](https://doi.org/10.3109/01913123.2012.679353)

Farzollahi M., Tayefi-Nasrabadi H., Mohammadnejad D., Abedelahi A. (2016). Supplementation of culture media with vitamin E improves mouse antral follicle maturation and embryo development from vitrified ovarian tissue. *Journal of Obstetrics and gynaecology Research*, 42, 526-535. doi: [10.1111/jog.12933](https://doi.org/10.1111/jog.12933)

Fisher A.B. (2011). Peroxiredoxin 6: a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A₂ activities. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15, 831-844. doi: 10.1089/ars.2010.3412.

Gallelli C.A., Calcagnini S., Romano A., Koczwara J.B., de Ceglia M., Dante D., Villani R., Giudetti A.M., Cassano T., Gaetani S. (2018). Modulation of the Oxidative Stress and Lipid Peroxidation by Endocannabinoids and Their Lipid Analogues. *Antioxidants*, 7, 2-44. doi: 10.3390/antiox7070093.

Harvey A.J., Kind K.L., Thompson J.G. (2002). REDOX regulation of early embryo development. *Reproduction*, 123, 479–486. doi: <https://doi.org/10.1530/rep.0.1230479>

Ijeh I.I.1., Omodamiro O.D., Nwanna, I.J. (2005). Antimicrobial effects of aqueous and ethanolic fractions of two spices, *Ocimum gratissimum* and *Xylopiya aethiopica*. *African Journal of Biotechnology*, 4, 953-956. doi: <https://doi.org/10.5897/AJB2005.000-3193>.

Joshi R.K. (2013). Chemical Composition, In Vitro Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Essential Oils of *Ocimum Gratissimum*, *O. Sanctum* and their Major Constituents. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75, 457–462. doi:10.4103/0250-474X.119834

Kala M., Nivsarkar M. (2016). Role of cortisol and superoxide dismutase in psychological stress induced anovulation. *General and Comparative Endocrinology*, 225, 117–124. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.09.010>

Kala M., Shaikh M.V., Nivsarkar M. (2016). Equilibrium between anti-oxidants and reactive oxygen species: a requisite for oocyte development and maturation. *Reproductive Medicine and Biology*, 16, 28-35. doi: 10.1002/rmb2.12013.

Kashka R.H.; Zavareh S., Lashkarbolouki T. (2016). Augmenting effect of vitrification on lipid peroxidation in mouse preantral follicle during cultivation: Modulation by coenzyme Q10. *Systems Biology In Reproductive Medicine*, 62, 404-414. doi: <http://dx.doi.org/10.1080/19396368.2016.1235236>.

Leyens G., Knoops B., Donnay I. (2004). Expression of peroxiredoxins in bovine oocytes and embryos produced *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*, 69, 243-251, doi: 10.1002/mrd.20145.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 25, 402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262

Martín-Romero F.J., Miguel-Lasobras E.M., Domínguez-Arroyo J.A., González-Carrera E., Alvarez I.S. (2008). Contribution of culture media to oxidative stress and its effect on human oocytes. *Reproductive BioMedicine Online*, 17, 652-661. doi: 10.1016/s1472-6483(10)60312-4.

Melo R.S., Azevedo Á.M.A., Pereira A.M.G., Rocha R.R., Cavalcante R.M.B., Matos M.N.C., Lopes P.H.R., Gomes G.A., Rodrigues T.H.S., Santos H.S.D., Ponte I.L., Costa R.A., Brito G.S., Catunda Júnior F.E.A., Carneiro V.A. (2019). Chemical Composition and Antimicrobial Effectiveness of *Ocimum gratissimum* L. Essential Oil Against Multidrug-Resistant Isolates of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Moleculares*, 24, 2-17. doi: 10.3390/molecules24213864.

Mohr, F.B.M., Lermen C., Gazim Z.C., Gonçalves J.E., Alberton O. (2017). Antifungal Activity, Yield, and Composition of *Ocimum Gratissimum* Essential Oil. *Genetics and Molecular Research*, 16, 1-10, doi: 10.4238/gmr16019542

O'Brien M.J., Pendola J.K., Eppig J.J. (2002). A revised protocol for in vitro development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. *Biology of Reproduction*, 68, 1682-1686. doi: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.013029>.

Oliveira L.B.S., Batista A.H.M., Fernandes F.C., Sales G.W.P., Nogueira N.A.P. (2016). Atividade antifúngica e possível mecanismo de ação do óleo essencial de folhas de *Ocimum gratissimum* (Linn.) sobre espécies de *Candida*. *Revista Brasileira de plantas Medicinai*s, 18, 511-523. doi: https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_222.

Park Y.S., You S.Y., Cho S., Jeon H.J., Lee S.; Cho D.H., Kim J.S., Oh J.S. (2016). Eccentric localization of catalase to protect chromosomes from oxidative damages during meiotic maturation in mouse oocytes. *Histochemistry and Cell Biology*, 146, 281–288. doi: [10.1007/s00418-016-1446-3](https://doi.org/10.1007/s00418-016-1446-3).

Pereira, C. A., M.; Maia, J. F. (2007). Study of the antioxidant activity and essential oil from wild basil (*Ocimum gratissimum* L.) leaf. *Food Science and technology*, 27, 624-632. doi: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000300030>.

Ponnusam Y., Louis T., Madhavachandran V., Kumar S., Thoprani N., Hamblin M.R., Lakshmanan S. (2015). Antioxidant Activity of The Ancient Herb, Holy Basil in CCl₄-Induced Liver Injury in Rats. *Ayurvedic*, 2, 34-38, doi: [10.14259/av.v2i2.176](https://doi.org/10.14259/av.v2i2.176).

Prakash J., Kotwal A.S.M., Ryali V.S.S.R., Srivastava K., Bhat P.S., Shashikumar R.A. (2010). Androginia tem atributos psicoprotetores? Estudo transversal de base comunitária. *Industrial psychiatry Journal*, 19, 119-124, doi: <http://www.industrialpsychiatry.org/text.asp?2010/19/2/119/90343>.

Sá N.A.R., Bruno J.B., Guerreiro D.D., Cadenas J., Alves B.G., Cibin F.W.S., Leal-Cardoso J.H., Gastal E.L., Figueiredo J.R. (2018). Anethole reduces oxidative stress and improves in vitro survival and activation of primordial follicles. *Brazilian Journal of medical and Biological Research*, 51, 1-8, doi: 10.1590/1414-431x20187129.

Santos L.P., Barros, V.R.P., Cavalcante A.Y.P. Menezes V.G. Macedo T.S.J. Araújo, 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. *Reproduction in domestic animals*, 49, 783-789. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/rda.12369>.

Silva J.R., Van Den Hurk R., Figueiredo J.R. (2016). Ovarian follicle development *in vitro* and oocyte competence: advances and challenges for farm animals. *Domestic Animal Endocrinology*, 55, 123-135. doi: 10.1016/j.domaniend.2015.12.006

Torres R.G., Casanova L., Carvalho J., Marcondes M.C., Costa S.S., Sola-Penna M., Zancan P. (2018). *Ocimum basilicum* but not *Ocimum gratissimum* present cytotoxic effects on human breast cancer cell line MCF-7, inducing apoptosis and triggering mTOR/Akt/p70S6K pathway. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 50, 93-105. doi: 10.1007/s10863-018-9750-3.

Trevisan M.T., Vasconcelos Silva M.G., Pfundstein B., Spiegelhalter B., Owen R.W. (2006). Characterization of the volatile pattern and antioxidant capacity of essential oils from different species of the genus *Ocimum*. *Journal of Agriculture and food chemistry*, 54, 4383-4382. doi: 10.1021/jf060181+.

Van Den Hurk R., Spek, E. R., Hage W.J., Fair, T., Ralph J.H., & Schotanus K. (1998). Ultrastructure and viability of isolated bovine preantral follicles. *Human Reproduction Update*, 4, 833–841. doi: <https://doi.org/10.1093/humupd/4.6.833>.

Yang L., Wang Q., Cui M., Li Q., Zhao Z. (2020). Effect of melatonin on the in vitro Maturation of Porcine Oocytes, Development of Parthenogenetically Activated Embryos, and Expression of Genes Related to the Oocyte Developmental Capability. *Animals*, 209, 2-13. doi: 10.3390/ani10020209.

ARTIGO 2

Effects of Eugenol on in vitro growth, viability and expression of mRNA for antioxidant enzymes in cultured bovine secondary follicles

Eugenol influences the expression of messenger RNAs for SOD and PRDX6 in bovine secondary follicles cultured *in vitro*

E. M. Vasconcelos¹; F. C. Costa¹; A. V. N. Azevedo¹; P. A. A. Barroso¹; E. I. Teixeira¹; L. R. F. M. Paulino¹; B. R. Silva¹; A. W. B. Silva¹; A. L. P. Souza¹; J.R.V. Silva^{1*}

¹Postgraduate Program in Biotechnology, Laboratory of Biotechnology and Physiology of Reproduction (LABIREP), Federal University of Ceara, Av. Comandante Mauricélio Rocha Ponte 100, CEP 62041-040, Sobral, CE, Brazil.

Corresponding author: J.R.V. Silva: Biotechnology Nucleus of Sobral - NUBIS, Federal University of Ceara, Av. Comandante Maurocélío Rocha Ponte 100, CEP 62041-040, Sobral, CE, Brazil. Phone / Fax: +55 88 36118000 [jrvsilva@ufc.br]

E-mail address: roberto_viana@yahoo.com

Abstract

This study aimed to investigate the effects of different concentrations of Eugenol on growth, viability, antrum formation and the gene expression of bovine secondary follicle culture *in vitro*. Bovine ovaries were collected in local slaughterhouse and in the laboratory; follicles were isolated from the ovarian cortex. The follicles were grown in TCM-199+ alone or supplemented with different concentrations of Eugenol (0.5, 5.0 and 50.0 μ M). Follicular diameters and antrum formation were evaluated on days 0, 6, 12 and 18. The viability analysis was performed using calcein and homidimer ethidium. Real-time PCR was used to quantify mRNA levels for SOD, CAT, GPX1 and PRDX6 in cultured follicles. Follicular diameters and mRNA levels in follicles grown in different treatments were compared by ANOVA and Kruskal-Wallis tests, follicular survival and antrum formation were compared using the chi-square test ($P < 0.05$). The results showed that secondary follicles grown with Eugenol maintained similar morphology and viability to the control group. A progressive increase in follicular diameter

was observed between days 0 and 12 in all treatments, except for follicles grown with 50 μM Eugenol. 5.0 and 50.0 μM Eugenol increased mRNA levels for PRDX6 in follicles, but 0.5 μM Eugenol reduced mRNA levels for SOD in cultured follicles. Eugenol did not influence mRNA expression for CAT and GPX1. In conclusion, Eugenol reduces levels of mRNAs for SOD and increases the levels of PRDX6 in bovine secondary follicles grown *in vitro*. Eugenol maintained follicular viability and morphology, but reduces follicular growth when in high concentration (50 μM).

Keywords: antioxidant, bovine, eugenol, preantral follicles.

1. Introduction

In mammals, preantral follicles represent approximately 90% of ovarian follicular population, but most of them (around 99.0%) became atretic during growth and maturation (Hsueh *et al.*, 2015). Thus, isolation and *in vitro* culture of these follicles open a new possibility of maximizing the use of oocytes enclosed in preantral follicles and, consequently, has gained great scientific impact (Figueiredo *et al.*, 2019). It is important to note that in bovine species, primordial follicles are activated and begin to grow at least 100 days before ovulation (Britt, 1991), which means that, *in vitro*, these follicles need to be cultured for long periods. However, one of the main obstacles during *in vitro* culture of preantral follicles is the excessive production of reactive oxygen species (ROS), caused by factors such as manipulation, absence of physiological protection mechanisms and increased oxygen levels in the cellular environment (SÁ *et al.*, 2018). Such factors cause a redox imbalance, generating oxidative stress, which in turn compromises the quality of cultured follicles (Sies, 2015; Saeed-Zidane *et al.*, 2017).

During *in vitro* culture, follicles are exposed to higher concentrations of oxygen (up to 20%) than those physiological levels (SÁ *et al.*, 2018). Consequently, *in vitro* grown follicles

have less developmental capacity than those that had developed in the natural environment. Oxidative stress during *in vitro* culture can cause severe cellular damage, such as lipid peroxidation, protein denaturation, alterations in nucleic acids, and membrane disruption (Halliwell, 2014). Kashka *et al.* (2016) reported that lipid peroxidation of membranes, mitochondrial lesions and impaired cell integrity results in low production of competent oocytes during *in vitro* culture. Additionally, lesions caused by ROS promote the inactivation of antioxidant enzymes, such as glutathione (GSH), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and peroxiredoxins (PRDX) that act physiologically to balance cellular homeostasis (Sovernigo *et al.*, 2017). In order to minimize the damages caused by oxidative stress during *in vitro* culture, substances with antioxidant activity are added in culture media, such as Eugenol (Barberino *et al.*, 2015).

Eugenol (4-allyl-2-methoxyphenol) contains phenolic compounds in its composition, which are responsible for protecting cells and tissues against damage caused by free radicals (Nagababu *et al.*, 2010). The phenol group found in Eugenol is the aromatic phenylpropanoid that is present in several groups of plants, including cloves (*Syzygium aromaticum*, Myrtaceae) and basil (*Ocimum basilicum*, Lamiaceae) (Alves *et al.*, 2017). Magalhães *et al.* (2018) showed that Eugenol reduces lipopolysaccharide-induced protein oxidation *in vivo*, through both anti-inflammatory and anti-oxidative effects, avoiding damage to mice lung structure. Eugenol also has antioxidant activity in human cell lines cultured *in vitro* (Slamenová *et al.*, 2009). In addition, the ability of Eugenol to inhibit ROS and lipid peroxidation is five times greater than that of α -tocopherol (Nagababu; Lakshmaiah, 1992; Nagababu; Lakshmaiah, 1994). Despite these studies, it is not known if Eugenol influences the expression of mRNA for antioxidant enzymes, such as glutathione (GSH), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and peroxiredoxins (PRDX), and if affects bovine preantral follicles growth and viability during *in vitro* culture.

The objectives of this study were to evaluate the effect of different concentrations of Eugenol (0.5, 5.0 and 50.0 μ M) on viability, growth, antrum formation and on the levels of mRNA for SOD, CAT, PRDX6 and GPX1 of bovine secondary follicles after 18 days of *in vitro* culture.

2. Material and methods

2.1 Chemicals

The culture media and other chemicals used in this study were purchased by Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA), unless otherwise indicated in the text.

2.2 Ovarian Collection

Ovaries of multiparous cows (n =50) were collected from a local slaughterhouse in Sobral, Ceara, Brazil. Immediately after death, the ovaries were washed in 70% ethanol for approximately 10 s, followed by two further washes in TCM-199 medium supplemented with penicillin (100 mg / ml) and streptomycin (100 mg / ml) and buffered with HEPES. Then, the ovaries were transported within 1 hour to the laboratory in TCM-199 at 4°C. This study was registered by the Committee of Ethics and Animal Welfare of the Federal University of Ceará.

2.3 Follicle isolation and in vitro culture

In the laboratory, the ovarian cortex was fragmented (1-2 mm) with a sterile scalpel blade and the fragments were placed in HEPES-buffered TCM-199 medium supplemented with

penicillin (100 mg / ml) and streptomycin (100 mg / ml). Secondary follicles measuring 150 to 250µm in diameter were manually isolated with the aid of 26-gauge needles and using a stereomicroscope (SMZ 645 Nikon, Tokyo, Japan). After isolation, follicles containing a visible oocyte surrounded by granulosa cells, an intact basement membrane, and without the presence of an antral cavity were selected for culture. Then, follicles were individually cultured in 100 µl drops of culture medium in Petri dishes (60 × 15 mm; Corning, USA). The control medium, identified as TCM-199⁺, consisted of TCM - 199 (pH 7.2-7.4) supplemented with 3.0 mg / ml bovine serum albumin (BSA), 100IU penicillin/streptomycin, 10 µg / ml insulin, 5.5 µg / ml transferrin and 5 ng / ml selenium (ITS), 50 µg / ml ascorbic, 100 ng / ml FSH, 2 mM glutamine and 2 mM hypoxanthine. The follicles were randomly distributed and cultured in TCM-199⁺ alone or supplemented with 0.5, 5.0 or 50.0 µM of Eugenol. The concentrations used were based on the study by Lopes *et al.* (2018). In each treatment, approximately 60 follicles were cultured. Follicles culture was performed at 38.5°C with 5% CO₂ in air for 18 days. Every two days of culture, 60 µl of medium was replaced with fresh medium. The percentage of follicles considered morphologically normal was evaluated on days 0, 6, 12 and 18 of culture. Follicles containing an opaque and / or extruded oocyte and having opaque granular cells were considered degenerate. For follicular diameter evaluation, two perpendicular measurements were performed in normal follicles using an inverted microscope with Nis elements 2.4 software (Nikon, Nikon Instruments Inc., Japan).

2.4 Assessment of preantral follicles viability by fluorescence microscopy

After 18 days of culture, follicles (n = 20 / treatment) were incubated in 100 µl droplets of TCM-199 medium supplemented with 4 mM calcein AM and 2 mM ethidium homodimer - 1 (Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe, Germany) at 37°C for a period of 15 minutes. The

follicles were then washed three times in TCM-199 medium and then examined under a fluorescence microscope (Nikon, Eclipse, TS 100, Japan). Oocytes and granulosa cells were considered viable if the cytoplasm was positively stained with calcein AM (green) and unviable if the chromatin was positively labeled with ethidium-1 homodimer (red) (Van Den Hurk *et al.*, 1998).

2.5 Expression of mRNA for *SOD*, *CAT*, *PRDX6* and *GPX1* in cultured follicles

Normal follicles that had been cultured for 18 days in each treatment were collected and then stored at -80°C until extraction of total RNA for further analysis of the levels of mRNA for *SOD*, *CAT*, *PRDX6* and *GPX1*. Total RNA extraction was performed using a Trizol® purification kit (Invitrogen, São Paulo, Brazil) in accordance with the manufacturer's instructions. Quantification of mRNA was performed using SYBR Green. PCR reactions were composed of 1 μL cDNA as a template in 7.5 μL of SYBR Green Master Mix (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 5.5 μL of ultra-pure water, and 0.5 μM of each primer. The primers were designed to perform amplification of *SOD*, *CAT*, *PRDX6*, *GPX1* and *GAPDH* (Table 1). The specificity of each primer pair was confirmed by melting curve analysis of PCR products. The thermal cycling profile for the first round of PCR was initial denaturation and activation of the polymerase for 10 min at 95°C , followed by 40 cycles of 15 s at 95°C , 30 s at 58°C , and 30 s at 72°C . The final extension was for 10 min at 72°C . All reactions were performed in a Step One Plus instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The $\Delta\Delta\text{Ct}$ method was used to transform the Ct values into normalized relative expression levels (Livak and Schmittgen, 2001).

Table 1 - Primer pairs used for real-time PCR.

Target gene	Primer sequence (5' → 3')	Sense (S), anti-sense (As)	GenBank accession no.
<i>GAPDH</i>	TGTTTGTGATGGGCGTGAACCA ATGGCGCGTGGACAGTGGTCATAA	S AS	GI: 402744670
<i>PRDX6</i>	GCACCTCCTCTTACTTCCCG GATGCGGCCGATGGTAGTAT	S AS	GI: 59858298
<i>GPX1</i>	AACGTAGCATCGCTCTGAGG GATGCCCAAACCTGGTTGCAG	S AS	GI: 156602645
<i>SOD</i>	GTGAACAACCTCAACGTCGC GGGTTCTCCACCACCGTTAG	S AS	GI: 31341527
<i>CAT</i>	AAGTTCTGCATCGCCACTCA GGGGCCCTACTGTCAGACTA	S AS	GI: 402693375

2.6 Statistical analysis

Data on follicular diameters were submitted to statistical analysis using the Kolmogorov-Smirnov and Bartlett test to assess normal distribution and homoscedasticity, respectively. These data were then evaluated by ANOVA. For comparisons of follicular diameters and levels of mRNA between treatments, the Kruskal-Wallis test (Graphpad prism software, version 5.0) was used. Percentages of follicles with different daily growth rate, follicular survival and antrum formation data after *in vitro* culture within each treatment were compared by the chi-square test. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

3. Results

3.1 Effects of Eugenol on follicular growth, antrum formation and viability

A significant and progressive increase in follicular diameter was observed from day 0 up to day 12 of *in vitro* culture in all treatments (Table 2). The only exception was for secondary

follicles cultured in medium supplemented with 50 μ M Eugenol, which had significant growth until day 6, but not after 12 and 18 days. When comparisons were made between treatments, no significant difference was observed growth. No effect of Eugenol on follicular daily growth rate was observed (Table 2).

Table 2. Diameters and daily growth (Mean \pm SEM) of bovine secondary follicles after 0, 6, 12 and 18 days of in vitro culture in TCM-199⁺ alone or supplemented with 0.5, 5.0 or 50.0 μ M of Eugenol (EUG)

	Day 0	Day 6	Day 12	Day 18	Daily growth
TCM-199⁺	221.1 \pm 5.5 ^a	260.0 \pm 6.7 ^b	275.1 \pm 8.4 ^c	278.2 \pm 11.0 ^c	4.4 \pm 3.5
EUG 0.5 μM	220.7 \pm 6.3 ^a	273.7 \pm 8.7 ^b	300.1 \pm 10.7 ^c	307.1 \pm 12.0 ^c	4.8 \pm 4.1
EUG 5.0 μM	223.3 \pm 5.5 ^a	269.2 \pm 6.5 ^b	282.5 \pm 9.6 ^c	290.6 \pm 11.8 ^c	4.8 \pm 3.8
EUG 50.0 μM	226.1 \pm 5.1 ^a	300.4 \pm 28.8 ^b	281.4 \pm 8.4 ^b	284.5 \pm 10.1 ^b	4.5 \pm 2.9

Significantly different ($p < 0.05$).

a, b, c Lower case letters represent statistically significant differences between days of culture for each treatment (between columns).

Table 3 shows the percentage of normal follicles and antrum formation after 18 days of culture in control medium alone or supplemented with different concentrations of Eugenol. The great majority of the follicles remained viable after culture in all treatments, and the percentage of normal follicles after culture in medium supplemented with 50 μ M eugenol was higher than that seen in follicles cultured with 0.5 μ M Eugenol. However, no significant differences were observed among the percentage of normal follicles after culture in control medium alone or supplemented with Eugenol in the different concentration. No differences were also observed in the percentage of antrum formation after follicle culture in the different treatments.

Table 3. Percentages of morphologically normal secondary follicles and of antrum formation after 18 days of *in vitro* culture in TCM-199⁺ alone or supplemented with 0.5, 5.0 or 50.0 μM of Eugenol (EUG).

%	TCM-199 ⁺	EUG 0.5 μM	EUG 5 μM	EUG 50 μM
Morphologically				
normal follicles	83.8% (52/62) ^{ab}	80.8% (55/68) ^b	89.3% (67/75) ^{ab}	93.9% (62/66) ^a
Antrum				
formation	23.1% (12/52)	23.6% (13/55)	23.9% (16/67)	27.4% (17/62)

Significantly different ($p < 0.05$)

a, b Lower case letters represent statistically significant differences between days of culture for each treatment (between columns).

3.2 Effects of Eugenol on follicular viability

Fluorescence microscopy analysis showed that, after 18 days of culture in control medium alone or supplemented with 0.5 μM , 5.0 μM and 50.0 μM of Eugenol, all follicles previously considered morphologically normal by light microscopy were viable, since they stained positively for calcein-AM, but not for ethidium homodimer (Figure 1). On the other hand, some stromal cells organized around the follicles cultured in all treatments were positively stained with ethidium homodimer.

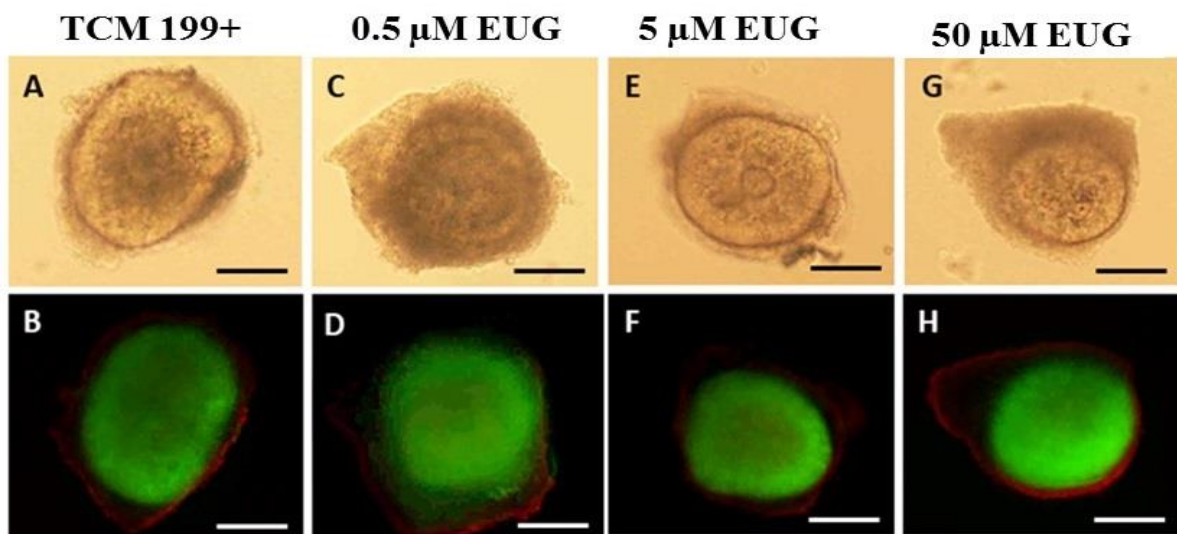


Figure 1. Viability of bovine secondary follicles cultured for 18 days after staining with calcein-AM (green) and

ethidium homodimer-1 (red). Secondary follicles cultured in TCM-199⁺ alone (a, b) or supplemented with 0.5 μ M, 5.0 μ M or 50.0 μ M of Eugenol (EUG). The scale bars represent 100 μ m.

3.3 Expression of mRNA for SOD, CAT, PRDX6 and GPX1 in cultured follicles

Figure 2 shows the levels of mRNA for *SOD*, *CAT*, *PRDX6* and *GPX1* in bovine secondary follicle after 18 days of culture in TCM-199⁺ alone or supplemented with Eugenol. The presence of 5.0 and 50.0 μ M Eugenol in culture medium significantly increased the levels of mRNA for PRDX6 in secondary follicles when compared with those cultured in control medium ($P < 0.05$). However, secondary follicles cultured in presence of 0.5 μ M Eugenol had the levels of mRNA for SOD reduced, when compared to control medium. On the other hand, the presence of Eugenol in culture medium did not influence the expression of mRNA for CAT and GPX1 in cultured follicles.

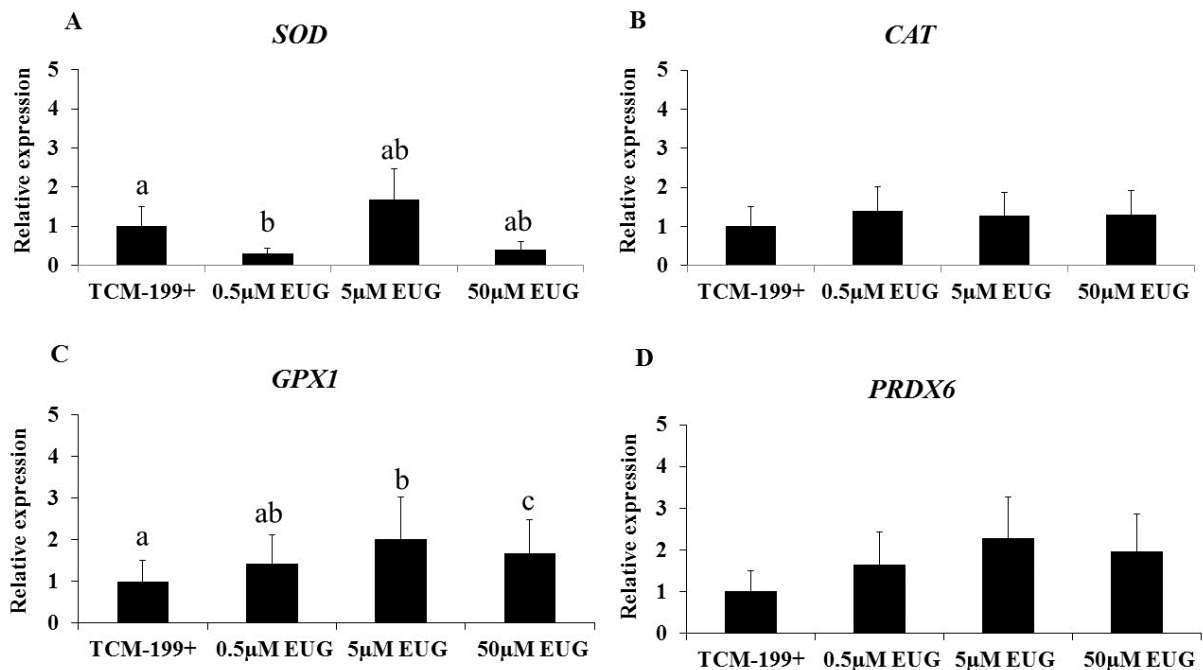


Figure 2. Levels of mRNA (means \pm SD) for (A) SOD, (B) CAT, (C) PRDX6 and (D) GPX1 in secondary follicles cultured *vitro* for 18 days in TCM 199⁺ alone or supplemented with 0.5, 5.0 or 50.0 μ M of Eugenol (EUG). ^{a,b,c} Represent statistically significant differences between treatments ($P < 0.05$).

4. Discussion

This study shows for the first time that Eugenol influences the expression of messenger RNAs for SOD and PRDX6 in bovine secondary follicles cultured in vitro. Changes in the levels of antioxidant enzyme activities might constitute a relevant biomarker of the cellular response to oxidative stress (Salah *et al.*, 2019). SOD catalyzes the dismutation of the extremely reactive superoxide anion to H₂O₂, which can further be separated into water and oxygen by CAT or Gpx. Reduction in the levels of mRNA for SOD in bovine secondary follicles cultured in presence of Eugenol can be associated with diminished intracellular levels of reactive superoxide anion in vitro. Salah *et al.* (2019) reported that Eugenol reduced ROS and O₂⁻ production in intestinal cell lines (HCT116) cultured in vitro and, consequently, these cells had reduced activities of SOD and CAT. It has been reported that phenolic antioxidants including Eugenol have the capacity to enhance the antioxidant enzyme activities (Zhao *et al.* 2006; Tiku *et al.* 2004). In vivo, Eugenol also reduced peroxidation in mice liver and reduced oxidative stress (Tiku *et al.*, 2004). Reduction of lipid peroxidation in the oocyte is very important, since the products of this process, such as malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal (4HNE) have traditionally been viewed as toxic substances (Galleli *et al.* 2018). Eugenol possesses the antioxidant property due to its phenolic hydroxyl group that donates electrons to quench free radicals (Fouad and Yacoubi 2011).

This study showed that Eugenol increases the levels of mRNAs for PRDX6 in bovine follicles cultured in vitro. PRDX6 is an enzyme with antioxidant activity and it is widely present in the intracellular environment to promote the protection of cells against damage caused by exposure to high levels of oxygen (Wang, 2006). It is important to highlight that, during in vitro culture; the cells are exposed to concentrations of oxygen (up to 20%) higher than those physiological levels (Sá *et al.*, 2018). Leyens *et al.* (2004) showed that expression of mRNA and protein for PRDX6 is upregulated in bovine oocytes and cumulus cells during in vitro

maturation, emphasizing that increasing expression of PRDX6 is important for oocyte growth and acquisition of competency. These authors also reported that PRDX6 transcripts are stored in the oocyte for later use in early embryos. PRDX6 peroxide reductase activity controls the levels of hydrogen peroxides in COC and early embryos (Harvey *et al.*, 2002). PRDX6 can also use the glutathione accumulated both in the oocyte and cumulus cells during maturation to reduce its oxidized form during the peroxidation process (de Matos *et al.* 1997). In addition to its peroxidase activity, Prdx6 expresses acidic calcium-independent phospholipase A2 and lysophosphatidylcholine acyl transferase activities in separate catalytic sites (Arevalo; Vázquez-Medina, 2018). Phospholipase A2 activity in cumulus cells is linked to the production of arachidonic acid for the production of prostaglandins, involved in oocyte maturation process (Elvin *et al.*, 2000; Calder *et al.*, 2001). Fernandez *et al.* (2019) also reported that PRDX6 promoted the survival of human sperm in vitro through activation of the PI3K-AKT pathway.

The expression of mRNA for CAT and GPX1 was not influenced by Eugenol in in vitro cultured bovine secondary follicles. It is known that GPX1 catalyzes the oxidation of glutathione into hydroperoxide, playing a role in repairing damage caused by lipid peroxidation (Kurutas, 2016). CAT has an important role during follicle development, since it neutralizes H₂O₂ and maintains the balance between the production of ROS also influences the production steroidal hormones (Wang *et al.*, 2017). During meiotic maturation of mouse oocytes, it has been observed that catalase protects the genome from oxidative damage (Park *et al.*, 2016). CAT acts in the oocyte nucleus to avoid chromosomal defects, and inhibition of this enzyme is associated with chromosomal misalignment and DNA damage (Park *et al.*, 2016). The absence of changes in the levels of CAT and GPX1 can be associated with the maintenance of the equilibrium between antioxidants and pro-oxidants during follicular culture.

5. Conclusion

In conclusion, Eugenol reduces the levels of mRNAs for SOD and increases those of PRDX6 in bovine secondary follicles cultured *in vitro* for 18 days. Eugenol also kept follicle viability and morphology, but it reduced follicle growth when used in high concentration (50 μ M). This study shows the potential of Eugenol to control oxidative stress during the culture of preantral follicles *in vitro*.

Financial Support

This research was supported by grants from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES). J.R.V. Silva is an investigator for CNPq. E. M. Vasconcelos is the recipient of a MSc scholarship from The Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel (CAPES), Brazil.

Statement of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific work.

Ethical standards

The authors declare that all procedures were performed according to national and institutional guides on the care and use of animals.

6. References

Alves JCO, Ferreira GF, Santos JR, Silva LCN, Rodrigues JFS, Neto WRN, Farah EI, Santos ARC, Mendes BS, Sousa LVNF, Monteiro AS, Dos Santos VL, Santos DA, Perez AC, Romero

TRL, Denadai AML, Guzzo LS (2017). Eugenol Induces Phenotypic Alterations and Increases the Oxidative Burst in *Cryptococcus*. *Front Microbiol*, 8, 2419.

Arevalo JA, Vázquez-Medina JP (2018). The Role of Peroxiredoxin 6 in Cell Signaling. *Antioxidants*, 24, 1-13.

Barberino RS, Barros VRP, Menezes VG, Santos LP, Araújo VR, Queiroz MAA, Almeida JRGS, Palheta RC, Matos MHT (2015). *Amburana cearensis* leaf extract maintains survival and promotes in vitro development of ovine secondary follicles. *Zygote*, 24, 277-285.

Britt JH (1991). Impacts of early postpartum metabolism on follicular development and fertility. *The Bovine Practitioner Proceeding*, 24, 39-43.

Calder MD, Caveney AN, Westhusin ME, Watson AJ (2001). Cyclooxygenase-2 and prostaglandin E₂(PGE₂) receptor messenger RNAs are affected by bovine oocyte maturation time and cumulus-oocyte complex quality, and PGE₂ induces moderate expansion of the bovine cumulus *in vitro*. *Biol Reprod*, 65, 135–140.

De Matos DG, Furnus CC, Moses DF (1997). Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. *Biol Reprod*, 57, 1420–1425.

Elvin JA, Yan C, Matzuk MM (2000). Growth differentiation factor-9 stimulates progesterone synthesis in granulosa cells via a prostaglandin E₂/EP₂ receptor pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 10288– 10293.

Figueiredo JR, Cadenas J, Lima LF, Santo RR (2019). Advances *in vitro* folliculogenesis in domestic animal ruminants. *Anim Reprod*, 16, 52-65.

Fernandez MC, Yu A, Moawad, AR, O'flaherty C (2019). Peroxiredoxin 6 regulates the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway to maintain human sperm viability. *Mol Hum Reproduc*, 25, 787–796.

Fouad A A, Yacoubi M T (2011). Mechanisms underlying the protective effect of eugenol in rats with acute doxorubicin cardiotoxicity. *Arch Pharm Res*, 4, 821-828.

Gallelli C.A, Calcagnini S, Romano A, Koczwara JB, de Ceglia M, Dante D, Villani R, Giudetti AM, Cassano T, Gaetani S (2018). Modulation of the Oxidative Stress and Lipid Peroxidation by Endocannabinoids and Their Lipid Analogues. *Antioxidants*, 7, 2-44.

Halliwell B (2014). Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: avoiding pitfalls. *Biomed J*, 37, 99-105.

Harvey AJ, Kind KL, Thompson JG (2002). REDOX regulation of early embryo development. *Reproduction*, 123, 479–486.

Hsueh AJ, Kawamura K, Cheng Y, Fauser, BC (2015). Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocr Ver*, 36, 1–24.

Kashka RH, Zavareh S, Lashkarbolouki T (2016). Augmenting effect of vitrification on lipid peroxidation in mouse preantral follicle during cultivation: Modulation by coenzyme Q10. *Syst Biol Reprod Med*, 62, 404-414.

Kurutas EB (2016). The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutr J*, 15, 171.

Leyens G, Knoop B, Donnay I (2004). Expression of peroxiredoxins in bovine oocytes and embryos produced *in vitro*. *Mol Reprod Dev*, 69, 243-251.

Livak, KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 25, 402-8.

Lopes AA, da Fonseca FN, Rocha TM, de Freitas LB, Araújo EVO, Wong DVT, Lima Júnior RCP, Lea LKAM (2018). Eugenol as a Promising Molecule for the Treatment of Dermatitis: Antioxidant and Anti-inflammatory Activities and Its Nanoformulation, *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 1-13.

- Magalhães CB, Casquilhoa NV, Machado MN, Riva DR, Travassos LH, Leal-Cardoso JH, Fortunato RS, Faffe DS, Zina WA (2018). The anti-inflammatory and anti-oxidative actions of eugenol improve lipopolysaccharide-induced lung injury, *Resp Physiol Neurobi*, 259, 1-7.
- Nagababu E, Lakshmaiah N (1992). Efeito inibitório do eugenol na peroxidação lipídica não enzimática em mitocôndrias de fígado de ratos. *Biochem pharmacol*, 43, 2393-2400.
- Nagababu E, Lakshmaiah N (1994). Inhibition of microsomal lipid peroxidation and monooxygenase activities by eugenol. *Free Radic Res*, 20, 235-266.
- Nagababu E, Rifkind JM, Boindala S, Nakka L (2010). Assessment of antioxidant activity of eugenol in vitro and in vivo. *Methods Mol Biol*, 610, 165-180.
- Park YS, You SY, Cho S, Jeon HJ, Lee S, Cho DH, Kim JS, Oh JS (2016). Eccentric localization of catalase to protect chromosomes from oxidative damages during meiotic maturation in mouse oocytes, *Histochem Cell Biol*, 146, 281–288.
- Sá NAR, Bruno JB, Guerreiro DD, Cadenas J, Alves BG, Cibin FWS, Leal-Cardoso, Gastal EL, Figueiredo JR (2018). Anethole reduces oxidative stress and improves in vitro survival and activation of primordial follicles. *Braz J Med Biol Res*, Ribeirão Preto, 51, 8, e7129.
- Salah A, Bouaziz C, Amara I, Abid-Essefi S, Bacha H (2019). Eugenol protects against citrinin-induced cytotoxicity and oxidative damages in cultured human colorectal HCT116 cells. *Environ Sci Pollut Res*, 26, 31374–31383.
- Tiku AB, Abraham SK, Kale RK (2004). Eugenol as an in vivo radio protective agent. *J Radiat Res*, 45, 435–440.
- Van Den Hurk R, Spek ER, Hage WJ, Fair T, Ralph JH, Schotanus K (1998). Ultrastructure and viability of isolated bovine preantral follicles. *Hum Reprod Update*, 4, 833–841.
- Saeed-Zidane M, Linden L, Salilew-Wondim D, Held E, Neuhoff C, Tholen E, Hoelker M, Schellander K, Tesfaye D (2017). Cellular and exosome mediated molecular defense mechanism in bovine granulosa cells exposed to oxidative stress. *Plos One*, 12, 11, 1-24.

Sies H (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol*, 4, 180-183.

Sovernigo TC, Adona PR, Monzani PS, Guemra S, Barros F, Lopes FG, Leal C (2017). Effects of supplementation of médium with diferente antioxidants during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequeute embryo production. *Reprod Domest Anim*, 52, 561-569.

Slamenová D, Horváthová E, Wsólová L, Sramková M, Navarová J (2009). Investigation of anti-oxidative, cytotoxic, DNA- damaging and DNA-protective effects of plant volatiles eugenol and borneol in human-derived HepG2, Caco-2 and VH10 cell lines. *Mutat Rese*, 677, 46-52.

Wang F, Xu SC, Zhou Y, Wang PM, Zhang XM (2017). Trace element exposure of whooper swans (*Cygnus cygnus*) wintering in a marine lagoon (Swan Lake), Northern China. *Mar Pollut Bull*, 119, 60–67.

Wang Y, Phelan SA, Manevich Y, Feinstein SI, Fisher AB (2006). Transgenic mice overexpressing peroxiredoxin 6 show increased resistance to lung injury in hyperoxia. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 34, 481-486.

Zhao GR, Xiang ZJ, Ye TX, Yuan YJ, Guo ZX (2006). Antioxidant activities of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng*. *Food Chem*, 99, 767–774.

CONCLUSÕES GERAIS

- O óleo essencial de *O. gratissimum* mantém a viabilidade, morfologia e crescimento folicular durante 18 dias de cultivo *in vitro*.
- O óleo essencial de *O. gratissimum* aumenta a expressão do mRNA para PRDX6 e CAT em folículos pré-antrais bovinos cultivados por 18 dias.
- O eugenol reduz os níveis de mRNAs para SOD, mas aumenta a expressão do mRNA para PRDX6 em folículos pré-antrais bovinos cultivados por 18 dias.
- O eugenol mantém a viabilidade e morfologia folicular, mas reduz o crescimento quando usado em altas concentrações (50 μ M).

PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho poderão auxiliar na compreensão dos efeitos do eugenol e do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* no crescimento folicular durante a fase pré-antral, com informações sobre a expressão de mRNAs de enzimas antioxidantes e do seu efeito sobre o desenvolvimento de folículos pré antrais bovinos. Além disso, estudos associados a outras substâncias antioxidantes, ou ainda, hormônios e fatores de crescimento em folículos pré-antrais são necessários para uma melhor compreensão da foliculogênese na espécie bovina. Adicionalmente é necessário a avaliação do eugenol e do óleo essencial de *O. gratissimum* sobre a expressão de genes relacionados ao crescimento e maturação oocitária *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ADONA, P. R. et al. Ovogênese e Foliculogênese em Mamíferos. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 15 n. 3. p. 245-50, 2013.
- AGUIYI, J.C. et al. Hyypoglycaemic activity of *Ocimum gratissimum* in rats. **Fitoterapia**, v.71, n.4, p.444-6, 2000.
- ANAND, A. et al. Comparative functional characterization of eugenol synthase from four different *Ocimum* species: Implications on eugenol accumulation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1864, n.11, p. 1539–1547, 2016.
- AGARWAL, A. et al. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod. Biol. Endocrinol*, v.10, n. 49, 2012.
- AKTHAR, M. S.; DEGAGA, B.; AZAM, T. Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: A review. *Biological Sciences and Pharmaceutical Research*, v. 2, n. 1, p. 001-007, 2014.
- ANGELI, J. P. F. **Hidroperóxidos de lipídeos como fontes de oxigênio molecular singleto (O₂ [¹Δg], detecção e danos biomoléculas**. 2011. 234 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Bioquímica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- AREVALO, J.A.; VÁZQUEZ-MEDINA, J.P. The Role of Peroxiredoxin 6 in Cell Signaling. **Antioxidants (Basel)**. v. 7, n. 12, p. 172, 2018.
- ALVES J. C. O et al. Eugenol Induces Phenotypic Alterations and Increases the Oxidative Burst in *Cryptococcus*. *Front Microbiol*, v.8, p. 2419, 2017. Doi: 10.3389/fmicb.2017.02419
- ANTONINO, D. C. et al. Morfometria de ovários de fetos bovinos: isolamento e quantificação de folículos pré-antrais. **Uningá**, Uberlândia, Mg, v. 22, n. 1, p.18-22, abr. 2017.
- AQUINO, V. V. F. et al. Metabólitos Secundários e ação antioxidante de *Croton heliotripifolius* e *Croton blanchetianus*. **Acta Brasiliensis**, v. 1, n. 3, p.7-10, 26 set. 2017. *Acta Brasiliensis*. <http://dx.doi.org/10.22571/actabra13201730>.
- ARAÚJO, V. R et al. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. **Reproductive biology and endocrinology**, v. 12, n. 1, p.78-92, 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1186/1477-7827-12-78>.
- ARAÚJO, V. R et al. Bone Morphogenetic Protein-6 (BMP-6) Stimulates the Antrum Formation by the Regulation of its Signalling Pathway in Caprine Pre-antral Follicles Cultured In Vitro. **Reprod Dom Anim**, n.51, p.59–68, 2016.

ARRANZ, E.; et al. Supercritical fluid extraction as an alternative process to obtain essential oils with anti-inflammatory properties from marjoram and sweet basil. **Ind Crops Prod.**, v. 67, p. 121–129, 2015.

ARUNAKUMARI, G.; SHANMUGASUNDARAM, N.; RAO, V. H. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. **Theriogenology**. v. 74, n.5 p. 884-94, 2010.doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.04.013

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

BARBOSA, C.O. et al. Óleo essencial de *Ocimum gratissimum*: caracterização química, atividade antioxidante, inibição de acetilcolinesterase e toxicidade. 2016. Disponível em: <http://www.abq.org.br/sinequi/2016/trabalhos/100/8704-22326.html>. Acesso em: Ago. 2019.

BARREIROS, A. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova.**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422006000100021>.

BECK, K. et al. Short-term culture of adult bovine ovarian tissues: chorioallantoic membrane (CAM) vs. traditional in vitro culture systems. **Reproductive Biology And Endocrinology.**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.2-10, 9 mar. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12958-018-0337-y>.

BEHRMAN, H.R.; KODAMAN, P.H.; PRESTON, S.L.; GAO, S. Oxidative stress and the ovary. **J Soc Gynecol Investig**, v.8, p.40-42, 2001.

BERIC, T. et al. Protective effect of basil (*Ocimum basilicum L.*) against oxidative DNA damage and mutagenesis. **Food Chem Toxicol.** v.46, n.2, p. 724-732, 2008. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.102>.

BERNARDI, M. L. Produção *in vitro* de embriões ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre/RS, v. 33, n. 1, p. 1-16. 2005.

BENTOV, Y.; YAVORSKA, T.; ESFANDIARI, N.; JURISICOVA, A.; CASPER, R.F. “The contribution of mitochondrial function to reproductive aging.” **Journal of Assisted Reproduction and enetics**, v. 28, n. 9, pp. 773–783, 2011.

BEZERRA, D. P. et al. The Dual Antioxidant/Prooxidant Effect of Eugenol and Its Action in Cancer Development and Treatment. **Nutrients**. v. 9, n. 12, p. 1367, 2017. doi:10.3390/nu9121367

BHATT, S. et al. Evaluation of antioxidant potential and quality of volatile constituents of fresh and sun dried *Ocimum gratissimum*. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 96, p. 297-304, 2019.

BHAVANI, T. et al. Phytochemical screening & antimicrobial activity of *Ocimum gratissimum* review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, v. 8, n. 2, p. 76-79, 2019.

CALEJA, C. et al. Foeniculum Mill. Utilizado como antioxidante em iogurtes: comparação entre o ingrediente natural e um aditivo sintético. PT. In: VIII ENCONTRO DE QUÍMICA DOS ALIMENTOS, 1., 2016. **Anais...** Porto:Universidade do Porto, 2016. P. 262-268.

CAMPBELL B. K, et al. Domestic ruminants as models for the elucidation of the mechanisms controlling ovarian follicle development in humans. **Reproduction Suppl.**, n.20, v.61, p.429-443, 2004.

CARNEIRO, N. S. et al. Essential oil of flowers from *Eugenia klotzschiana* (Myrtaceae): chemical composition and *in vitro* trypanocidal and cytotoxic activities. **Revista virtual de química.**, v. 9, n. 3, p.1381-1392, 2017. <http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20170080>.

CASTRO, S. V. **Efeito do método de criopreservação e do meio de cultivo *in vitro* sobre a capacidade de desenvolvimento de Folículos pré-antrais bovinos.** 2015. 149 f. Tese (Doutorado em Ciências veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2015. Disponível em: http://www.uece.br/ppgcv/dmdocuments/SimoneCastro_Tese.pdf>. Acesso em: 13 mai. 2018.

CHAUBE, S. K.; SHRIVASTAV, T. G.; PRASAD, S. Clomiphene citrate induces ROS-mediated apoptosis in mammalian oocytes. **Open J Apoptosis** 2014; 3: 52–58

CHANDRA J.; SAMALI A.; ORRENIUS, S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v.29, p.323-333, 2000.

CHAUDHARY, R. G. et al. Necroptosis in stressed ovary. **Journal of Biomedical Science**. v. 26, n. 11, 2019.

CHEN, Z. et al. Effects of melatonin on maturation, histone acetylation, autophagy of porcine oocytes and subsequent embryonic development. **Animal Science Journal**, v. 88, n. 9, p.1298-1310, 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/asj.12779>.

CUNHA, E. V. et al. Effects of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) on in vitro development and survival of bovine preantral follicles enclosed in fragments ovarian tissue. **Zygote**, v. 25, n 3, p. 256-264, 2017.

DE CESARO, M. P. **Regulação do sistema peptídeos natriuréticos nas células da granulosa e do cúmulo na foliculogênese em bovinos**. 2011. 205 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Área de Concentração em Sanidade em Reprodução animal. Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2011. Disponível em: <<http://w3.ufsm.br/ppgmvt/images/teses2017/Matheus%20PDC.pdf>>. Acesso em: 26 mar. 2018.

EDSON, M. A.; NAGARAJA, A. K.; MATZUK, M. M. The Mammalian ovary from genesis to revelation. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 6, p. 624–712, 2009. doi: 10.1210/er.2009-0012.

FANG, Y. Z.; YANG, S.; WU, G. Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. **Nutrition**.v. 18, n 10, p. 872-879, 2002.

FATHIAZAD, F. et al. Phytochemical screening and evaluation of cardioprotective activity of ethanolic extract of *Ocimum basilicum* L. (basil) against isoproterenol induced myocardial infarction in rats. **Daru Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 20, n.1, p.87–97, 2012.

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

FIGUEIREDO, J. R. et al. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção in vitro de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.143-152, 2007b.

FIGUEIREDO, J.R et al. **Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos PréAntrais**: biotécnicas aplicadas à reprodução animal, 2ª ed. São Paulo, Editora Roca. p. 303-327, 2008.

FILIPOVIC, M. et al. QSAR of the free radical scavenging potency of selected hydroxybenzoic acids and simple phenolics. **Comptes Rendus Chimie**, v. 18, n. 5, p.492-498, maio 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crci.2014.09.001>

FLOHÉ, L.; TOPPO, S.; COZZA, G. A comparison of thiol peroxidase mechanisms. **Antioxidant Redox Signal**, v. 15, n. 3, p. 763-780, 2011.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annu Rev Biochem.** v. 64, p. 97-112, 1995.

FORTUNE J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Anim. Reprod. Sci.**, v.7, p. 135-163, 2003.

GHAFFARI, Z.; RAHIMMALEK, M.; SABZALIAN, M. R. Variations in essential oil composition and antioxidant activity in *Perovskia abrotanoides* Karel collected from different regions in Iran. **Chemistry & Biodiversity**, 23 abr. 2018. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.201700565>.

GHATEBI, M. et al. Implications from early life stress on the development of mouse ovarian follicles: Focus on oxidative stress. **Journal Obstetrics Gynaecology Research**, v. 45, n. 8, p. 1506–1514, 2019. doi: 10.1111/jog.14007

GOUGEON, A.; BUSSO, D. Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary. **Mol Cell Endocrinol**, v.163, p.33-41, 2000.

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. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.068>

GREEN, L. J.; SHIKANOV, A. *In vitro* culture methods of pré antral follicles. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 229-238, 2016. Doi:<http://dx.doi.10.1016/j.theriogenology.2016.04.036>.

GUPTA, P. S. et al. Production of buffalo embryos using oocytes from in vitro grown preantral follicles. **Zygote**, v.16, n. 1, p.57-63, 2008.

HAHN, G. F.; OLIVEIRA, Rodrigues, J.; BOCK, P. M. O papel do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) no diabetes mellitus. **Clinical & Biomedical Research**, [s.l.], v. 37, n. 3, p.203-213, 2017. Editora Cubo Multimidia. <http://dx.doi.org/10.4322/2357-9730.73884>.

HALLIWELL, B. Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: avoiding pitfalls. **Biomed J.**, v. 37, n. 3, p. 99-105, 2014.

HALLIWELL, B.; CLEMENT, M. V.; LONG, L. H. Hydrogen peroxide in the human body. **FEBS Letters**. v. 486, p. 10-13, 2000.

HARVERY, M. B. ARCELLANA-PANLILIO, M. Y., ZHANG, X et al Expression of genes encoding antioxidant enzymes in preimplantation mouse and cow embryos and primary bovine oviduct cultures employed for embryo coculture. **Biology Reproduction**, v. 53, n. 3, p. 532-540, 1995

HICKEY, D.L. et al. Armstrong, Androgens Augment the Mitogenic Effects of Oocyte-Secreted Factors and Growth Differentiation Factor 9 on Porcine Granulosa Cells, **Biology of Reproduction**, v.73, n.4 ,p. 825–832, 2005. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.039362>

HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovary. **Int Rev Cytol.**, v.124, p.43-101, 1991.

HUNTER M.G. et al. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. **Anim Reprod Sci.**, v.82-83, p.461-477, 2004.

JAVANMARDI, J. et al. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. **Food chemistry**. v. 83, p. 547–550, 2003.

JOSHI R.K. Chemical Composition, In Vitro Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Essential Oils of *Ocimum Gratissimum*, *O. Sanctum* and their Major Constituents. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 75, 457–462, 2013. [doi:10.4103/0250-474X.119834](https://doi.org/10.4103/0250-474X.119834)

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12 . ed. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 558 p.

KAPEWANGOLO, P. et al. Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Ocimum labiatum* extract and isolated labdane diterpenoid. **Journal of inflammation**. v. 12, n. 4. 2015, [doi:10.1186/s12950-015-0049-4](https://doi.org/10.1186/s12950-015-0049-4)

KASHKA, R. H.; ZAVAREH, S.; LASHKARBOLOUKI, T. Augmenting effect of vitrification on lipid peroxidation in mouse preantral follicle during cultivation: Modulation by coenzyme Q10. **Systems Biology In Reproductive Medicine**, [s.l.], v. 62, n. 6, p.404-414, 3 out. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/19396368.2016.1235236>.

KHAKDAN, F. et al. The relationship between antioxidant compounds contents and antioxidant enzymes under waterdeficit stress in the three Iranian cultivars of basil (*Ocimum basilicum* L.). **Acta Physiol. Plant.** v. 38, n. 9, 2016.

KNIGHT, P.G.; GLISTER, C. Potential regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. **Reproduction**, v. 121, n. 4, p. 503-512, 2001.

KURUVILA, A. et al. Cloning and sequencing of FSH receptor gene from buffalo preantral follicles. **European journal of biological sciences**, v. 2, n. 4, p. 91-95, 2010.

LEE, L. et al. Changes in histone modification and DNA methylation of the StAR and Cyp19a1 promoter regions in granulosa cells undergoing luteinization during ovulation in rats. **Endocrinology**. v.154, n.1, p. 458-470, 2013. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1610>

LI, H.; GE, Y.; LUO, Z. et al. Evaluation of the chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of distillate and residue fractions of sweet basil essential oil. **J Food Sci Techno.** v. 54, n. 7, p. 1882-1890, 2017.

LI, L. et al. The effect of heat stress on gene expression, synthesis of steroids, and apoptosis in bovine granulosa cells. **Cell Stress Chaperones.**,v.21, n. 3, p. 467-475, 2016. <http://dx.doi: 10.1007/s12192-016-0673-9>

LIMA, F. F. et al. Dynamized follicle-stimulating hormone affects the development of ovine preantral follicles cultured *in vitro*. **Homeopathy.**, v. 102, n. 1, p. 41-48. 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.homp.2012.11.002>.

LINARD, C. F. B. M. **Estudo do efeito antinociceptivo do Eugenol.** 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2008.

LINS, T. I. B. G. et al. Rutin can replace the use of three other antioxidants in the culture medium, maintaining the viability of sheep isolated secondary follicles. **Theriogenology**, v. 89, p.263-270, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.019>.

LIU, Y. et al. Role of plant polyphenols in acrylamide formation and elimination. **Food Chemistry.**, [s.l.], v. 186, p.46-53, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.122>

LUCCI, C. M. et al. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. **Small Rum. Res.**, Estados Unidos, v. 41, n. 1, p. 61-69, jul. 2001.

LUSSIER, J. G.; MATTON, P.; DUFOUR, J. J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. **Journal of Reproduction & Infertility**, v. 81, n.2 , p. 301-307, 1987.

MARTINS, F. S. et al. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Rev Bras Reprod Anim.**, Belo Horizonte, v.32, n.1, p.36-49, jan./mar. 2008.

- MCLAUGHLIN, M. et al. Activin promotes follicular integrity and oogenesis in cultured pre-antral bovine follicles. **Molecular Human Reproduction**, [s.l.], v. 16, n. 9, p.644-653, 4 mar. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/molehr/gaq021>.
- MEHNI, F.; SHARIFIFAR, F.; ANSARI, M. Antioxidant activity and rosmarinic acid content of ten medicinal plants. **Res. Pharm.**, v.7, p.780, 2012.
- MELLO, R. R. C. et al. Desenvolvimento folicular inicial em bovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.37, n.4, p.328-333, out./dez. 2013.
- MELO, A.S. et al. Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.1, p.24-30, 2006.
- MIMURA, J.; ITOH, K. Role of Nrf2 in the pathogenesis of atherosclerosis. **Free Radic Biol Med**. V.88, p. 221-32, 2015.
- MIRANDA, C. A. S. F. et al. Essential oils from leaves of various species: antioxidant and antibacterial properties on growth in pathogenic species. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p.213-220, 2016. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/1806-6690.20160025>.
- MORAIS, S. M. et al. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de cróton do nordeste do Brasil. **Quim. Nova.**, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.
- MURAKAMI, Y.; KAWATA, A.; FUJISAWA, S. Expression of Cyclooxygenase-2, Nitric Oxide Synthase 2 and Heme Oxygenase-1 mRNA Induced by Bis-Eugenol in RAW264.7 Cells and their Antioxidant Activity Determined Using the Induction Period Method. **In Vivo**, Sakado, v. 31, n. 1, p.819-831, jun. 2017.
- NAGABABU E, LAKSHMAIAH N. Efeito inibitório do eugenol na peroxidação lipídica não enzimática em mitocôndrias de fígado de ratos. **Biochem pharmacol**, v. 43, p. 2393-2400, 1992.
- NAGABABU, E.; LAKSHMAIAH, N. Inhibition of microsomal lipid peroxidation and monooxygenase activities by eugenol. **Free Radical Research.**, v. 20, n.4, p.235-266, 1994.
- NITURE, S.K.; KHATRI, R.; JAISWAL, A. K. Regulation of Nrf2-an update. **Free Radic Biol Med**. v. 66, p. 36- 44, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.008>.

NAGABABU, E. et al. Assessment of Antioxidant Activity of Eugenol *in Vitro* and *In Vivo*. **Methods in Molecular Biology**. v. 610, p. 165-180, 2010.

O'BRIEN, M. J.; PENDOLA, J. K.; EPPIG, J. J. A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence, **Biol.Reprod.**, v. 68, n. 5, p. 1682-1686, 2003. doi: 10.1095/biolreprod.102.013029

OLIVEIRA, S. C.; SARAPIÃO, V. R.; QUINTÃO, C. C. R. **Biotécnicas em reprodução animal**. Juiz de Fora, MG: Embrapa gado de leite, 2014.

OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International**, v.74, p. 10-36, 2015.

PAULA-FREIRE, L. I. G. et al. *Ocimum gratissimum* Essential Oil and Its Isolated Compounds (Eugenol and Myrcene) Reduce Neuropathic Pain in Mice. **Planta Med.** v. 82, n.3, p. 211-216, 2015.

PANDEY, A. N.; CHAUBE, S. K. Reduction of nitric oxide level leads to spontaneous resumption of meiosis in diplotene-arrested rat oocytes cultured in vitro. **Experimental Biology and Medicine**, v. 240, n. 1, p.15-25, 2014.

PARK, Y. J. et al. Composition of volatile compounds and in vitro antimicrobial activity of nine *Mentha* spp. **Springerplus**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2016.

PLAZAS, D. C. S. **Efeitos dos extratos de *Spirulina maxima* e Kefir no cultivo de folículos pré-antrais de suínos**. 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/41455>>. Acesso em: 13 mai. 2018.

PRAKASH, J. et al. Androgenia tem atributos psicoprotetores? Estudo transversal de base comunitária. **Industrial psychiatry Journal**, v. 19, p. 119-124, 2010 doi: <http://www.industrialpsychiatry.org/text.asp?2010/19/2/119/90343>.

RAJANI, S.; et al. Assessment of oocyte quality in polycystic ovarian syndrome and endometriosis by spindle imaging and active oxygen species levels in follicular fluid and its relationship with IVF-ET outcome. **Journal of human reproduction sciences**, v. 5, n. 2, p. 187-193, 2012

RIBEIRO, L. F. **Avaliação dos compostos bioativos e atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* em bagaços de uvas (*Vitis vinífera* e *Vitis labrusca*)**. 2016. 125 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade

Federal do Paraná, Paraná, 2016. Disponível em:
<<https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/44719> >. Acesso em: 30 abr. 2018.

RIZZO, A., ROSCINO, M.T., BINETTI, F., SCIORSCI, R.L., Roles of reactive oxygen species in female reproduction. **Reprod. Domest**, v. 47, n. 2, p.344–352, 2012. RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas do oxigênio no meio biológico. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 21, n. 3, p. 133 – 149. Set./Dez. 2005.

ROCHA, C. D. **Vitrificação de tecido ovariano de fetos bovinos associada ao resveratrol**. 2017. 94 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017. Disponível em:
<https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/18468> >. Acesso em: 05 mai. 2018.

ROSSETO, R. et al. Avanços no isolamento e sistemas de cultivo de folículos pré-antrais. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.5, n.1, p.15-23, 2011.

SAEED-ZIDADE, M. et al. Cellular and exosome mediated molecular defense mechanism in bovine granulosa cells exposed to oxidative stress. **PlosOne**. v. 12, n. 11, p. 1-24, 2017. Doi:
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187569>

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 animals.**, v. 49, n. 5, p.783-789, 11 ago. 2014. Wiley-Blackwell.
<http://dx.doi.org/10.1111/rda.12369>.

SARAIVA, M.V.A. et al. Expression of follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) in goat ovarian follicles and the impact of sequential culture medium on in vitro development of caprine preantral follicles. **Zygote**, [s.l.], v. 19, n. 03, p.205-214, 21 dez. 2010. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0967199410000511>.

SAUMANDE, J. Ovogenèse et folliculogenèse. **Rec. Méd. Vét.** v.157, p. 29-38, 1981.

SENANAYAKE, U.M; WILLS, B.H; LEE, T.H. Biosynthesis of eugenol and cinnamic aldehyde in *Cinnamomum zeylanicum*. **Phytoch.**, v.16, n. 12, p-2032-2033, 1977.

SILVA, A. W. B. et al. Expression of TNF- α system members in bovine ovarian follicles and the effects of TNF- α or dexamethasone on preantral follicle survival, development and ultrastructure in vitro. **Anim Reprod Sci**. v. 182, p. 56-68, 2017a. doi:
10.1016/j.anireprosci.2017.04.010

SILVA, A. W. B. et al. *In vivo* effects of GnRH on expression of interleukin 1 (IL-1) system members in bovine preovulatory follicles and the influence of IL-1 β on cumulus-oocyte complexes cultured *in vitro*. **Livestock Science**. 2017 b.

SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; FIGUEIREDO, J.R. Ovarian follicle development in vitro and oocyte competence: advances and challenges for farm animals. **Domestic Animal Endocrinology**. v. 55, p. 123-135, 2016. doi: 10.1016/j.domaniend.2015.12.006.

SIRARD, M. A. Somatic environment and germinal differentiation in antral follicle: The effect of FSH withdrawal and basal LH on oocyte competence acquisition in cattle. **Theriogenology**, [s.l.], v. 86, n. 1, p.54-61, jul. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.018>.

SLAMENOVA, D. et al. Investigation of anti-oxidative, cytotoxic, DNA-damaging and DNA-protective effects of plant volatiles eugenol and borneol in human-derived HepG2, Caco-2 and VH10 cell lines. **Mutation Research**. v.677,p.46-52. 2009. Doi: [doi:10.1016/j.mrgentox.2009.05.016](https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.05.016)

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista Nutrição*, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002. doi: <https://doi.org/10.1590/S1415-52732002000100008>.

SOHEL, M. H. et al. Concentration dependent antioxidative and apoptotic effects of sulforaphane on bovine granulosa cells *in vitro*. **Theriogenology**. v. 97, p. 17-26. 2017.

SOUSA, M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 351 -355, 2007.

SPITSCHAK, M.; HOEFLICH, A. Potential Functions of IGFBP-2 for Ovarian Folliculogenesis and Steroidogenesis. **Frontiers in Endocrinology**, [s.l.], v. 9, p.1-10, 13 abr. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2018.00119>.

SRIVASTAVA, L.; [OJHA, S.](#); [TRIPATHI, N.](#); [SINGH, P.](#) In vitro antibacterial, antioxidant activity and total phenolic content of some essential oils. **J Environ Bio**. v.36, n. 6, p. 1329-36, 2015.

SWARUP, V. et al. Antiviral and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid in an experimental murine model of Japanese encephalitis. *Antimicrob. Agents Chemother*. v. 51, n. 9, p.3367–3370, 2007.

TAG, H. M. Hepatoprotective effect of mulberry (*Morus nigra*) leaves extract against methotrexate induced hepatotoxicity in male albino rat. **Bmc complementary and alternative medicine**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.1-9, 25 jul. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12906-015-0744-y>.

TRIPATHI, A.; KHATUN, S. A. PANDEY. “Intracellular levels of hydrogen peroxide and nitric oxide in oocytes at various stages of meiotic cell cycle and apoptosis,” **Free Radical Research**, vol. 43, no. 3, pp. 287–294, 2009.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L.; **Microbiologia**. 12. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TREVISAN, M.T. et al. Characterization of the volatile pattern and antioxidant capacity of essential oils from different species of the genus *Ocimum*. **Journal of Agriculture and food chemistry**, v. 54, p. 4383-4382, 2006. doi: 10.1021/jf060181+.

- VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.
- VIEIRA, R. F.; SIMON, J. E. Chemical characterization of basil (*Ocimum* spp.). **Found in the markets and used in traditional medicine in Brazil**. Economic Botany, Nova Iorque, v. 54, n.207, p-16, 2000.
- WHITAKER B. D., KNIGHT J. W. Mechanisms of oxidative stress in porcine oocytes and the role of anti-oxidants. **Reproduction, Fertility and Development**. n. 20, p. 694-702, 2008.
- YAMASHIRO. C. et al. Generation of human oogonia from induced pluripotent stem cells in vitro. **Science**, v. 362, n. 6412, p. 356-360, 2018.doi: 10.1126/science.aat1674.
- SHENG, Y.; et al. Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases. **Chem Rev**. v. 114, p. 3854–3918, 2014.
- MATTOS, K. **Efeito do β -mercaptoetanol na criotolerância à vitrificação em embriões bovinos produzidos *in vitro***. 2019. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós graduação em Zootecnia, Porto Alegre-RS, 2019.
-
- SILVA, A.P.T.B.; MELLO, R.R.C.; FERREIRA, J.E.; MELLO, M.R.B. Efeito do acasalamento entre a doadora e o touro (Holandês versus Gir) na produção *in vitro* de embriões bovinos. **Boletim de Indústria Animal**, v.72, p.51-58, 2015. Doi:http://dx.doi.org/10.17523/bia.v72n1p51.
- SÁ, N.A.R. et al. Anethole reduces oxidative stress and improves in vitro survival and activation of primordial follicles. **Braz J Med Biol Res**, v. 51, n. 8, e.7129, 2018.
- SHI, L., et al. Long-Term Moderate Oxidative Stress Decreased Ovarian Reproductive Function by Reducing Follicle Quality and Progesterone Production. **PloS one**, v. 11, n. (9), 2016. doi:10.1371/journal.pone.0162194
- TAMURA, H. et al. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. **Journal of Pineal Research**, v.44, n. 3, p. 280-287, 2008.
- WANG, Zhi-Jun et al. Review on cell models to evaluate the potential antioxidant activity of polysaccharides. **Food & function**, v. 8, n. 3, p. 915-926, 2017
- ZHANG, C.; et al. Apoptosis Mediates Lesions Induced by Oxidative Stress Through the JNK-FoxO1 Pathway. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v.11, n. 4, 2019.
- ZHANG, J. Q. et al. Critical Role of FoxO1 in Granulosa Cell Apoptosis Caused by Oxidative Stress and Protective Effects of Grape Seed Procyandin B2. **Oxid Med Cell Longev**. 2016. 6147345. <https://doi.org/10.1155/2016/6147345> PMID: 27057282

