



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CAMPUS SOBRAL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**SOLANO DANTAS MARTINS**

**MECANISMOS DE AÇÃO DA *Punica granatum* L. DURANTE A VITRIFICAÇÃO  
DE TECIDO OVARIANO**

**SOBRAL  
2024**

SOLANO DANTAS MARTINS

MECANISMOS DE AÇÃO DA *Punica granatum* L. DURANTE A VITRIFICAÇÃO DE  
TECIDO OVARIANO

Exame de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Análises integrativas de sistemas biológicos.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valdevane Rocha Araújo.

SOBRAL  
2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

M346m Martins, Solano Dantas.

Mecanismos de ação da *Punica granatum* L. durante a vitrificação de tecido ovariano /  
Solano Dantas Martins. – 2024.  
81 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa  
de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2024.  
Orientação: Profa. Dra. Valdevane Rocha Araújo.

1. Criopreservação. 2. Antioxidantes. 3. Câncer. 4. Câncer. I. Título.

CDD 660.6

---

SOLANO DANTAS MARTINS

MECANISMOS DE AÇÃO DA *Punica granatum* L. DURANTE A VITRIFICAÇÃO DE  
TECIDO OVARIANO

Exame de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Análises integrativas de sistemas biológicos

Aprovada em: 02/02/2024.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valdevane Rocha Araújo (Orientador)  
Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAr)

---

Prof. Dr. José Jackson do Nascimento Costa  
Centro Universitário INTA (UNINTA)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gerlane Modesto da Silva  
Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA)

A Deus.

Aos meus pais, Sabrina e Júnior.

Os meus maiores exemplos de força e  
determinação.

Com amor, dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Aos meus pais, Sabrina e Júnior, que sem dúvidas são as duas pessoas que mais acreditam nos meus sonhos e não medem esforços para me ver chegando lá.

A Prof. Valdevane Araújo, por todas as oportunidades que me foram dadas, desde a iniciação científica, e pela excelente orientação. Aos professores participantes da banca examinadora, Dr. José Jackson e Dra. Gerlane Modesto, pelo tempo dedicado e pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos amigos do meu grupo de pesquisa FISIOREP (João Filho, Fernanda Lima, Maria Alice, Camila Aguiar, Hyandra Emilly, Alesandro Silva, Israel Levi, Sara Bittencourt, Sabrina e Gabriel). Sem dúvida, são peças fundamentais para o meu crescimento, aprendizado e formulação deste trabalho. Agradeço, acima de tudo, pelo empenho e pelas boas risadas compartilhadas.

Aos meus amigos Isaac Santos, Luana de Sousa e Ana Normélia, por terem sido fonte de apoio sempre que foi necessário. Aos colegas do LABIREP (Igo Texeira, Francisco Chagas e Venância Azevedo), que contribuíram para a realização dos experimentos, e em especial ao professor, Dr. José Roberto Viana Silva, por ceder a sua infraestrutura laboratorial para realização deste trabalho.

A todos os membros do LABIEX que sempre me acolheram tão bem, e em especial à sua coordenadora, professora, Dra. Vânia Cecatto, por dispor de seu laboratório para realização das análises bioquímicas. Também agradeço à professora Dra. Sônia Nair Baó por realizar as análises de morfologia ultraestrutural.

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”

**Simone de Beauvoir**

## RESUMO

A criopreservação de gametas e embriões tem sido apresentada como uma alternativa viável, para preservação da fertilidade em pacientes oncológicos. No entanto, não é uma opção para jovens pré-púberes e pacientes que, por outras razões, precisem de um tratamento de forma imediata. Nesse contexto, o protocolo mais adequado para essas pacientes é a criopreservação do tecido ovariano e posterior autotransplante. Entretanto, a criopreservação é uma técnica que, apesar de eficaz, ainda apresenta limitações devido ao alto dano ocasionado às células foliculares e aos oócitos, decorrente da formação de espécies reativas de oxigênio (EROS). Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do extrato etanólico de *punica granatum L.* durante a vitrificação de tecido ovariano bovino, verificando a sua capacidade antioxidante, impactos na morfologia e ultraestrutura folicular. Também foi analisada a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GSH-Px), além dos níveis de Tiol, malonaldeído (MDA) e nitrito. Para isso, foram utilizados ovários de 12 animais que foram fragmentados e vitrificados na ausência ( $\alpha$ -MEM; Sacarose; Dimetilsulfóxido e soro fetal bovino) ou em diferentes concentrações do extrato etanólico de *punica granatum L.* (10, 50 e 100 $\mu$ g/mL), durante 5 dias, seguidos de aquecimento. Os tecidos foram avaliados logo após o aquecimento e também após serem incubados in vitro por 24h. Para as análises estatísticas, foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, seguido de análise de variância (ANOVA) two-way, com post-hoc de Tukey. Os dados de natureza qualitativa foram avaliados pelo qui-quadrado ( $\chi^2$ ) utilizando Graphpad Prism 9.0 (Graphpad Software, Inc., San Diego, EUA). A significância estatística foi considerada quando os resultados apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese nula menor que 5% ( $P < 0,05$ ). Como resultados, foi observado que a adição de 10 $\mu$ g/mL do extrato etanólico de *Punica granatum L.* promoveu a manutenção da morfologia folicular após o aquecimento. No entanto, essa preservação não foi observada após a incubação in vitro, havendo uma diminuição no número de folículos normais ( $P < 0,05$ ). Em contrapartida, foi possível observar a manutenção da densidade das células do estroma e da matriz extracelular (MEC). Além disso, a análise ultraestrutural demonstrou a degeneração das organelas presentes nos folículos vitrificados. Ao avaliar o perfil redox, não foram observadas diferenças significativas na atividade das enzimas CAT e GSH-PX, em ambos os períodos avaliados. Entretanto, durante o período de incubação, a concentração de



10µg/mL, promoveu maior atividade da SOD. Paralelamente, foi observada a manutenção dos níveis de MDA ( $P < 0,05$ ). Em conclusão, a adição de 10µg/mL do extrato etanólico de *Punica granatum L.* manteve uma morfologia folicular mais preservada, promovendo um aumentando na atividade de enzimas antioxidantes e reduzindo a peroxidação lipídica.

**Palavras-chave:** Criopreservação; Antioxidantes; Câncer; Ovário

## ABSTRACT

Cryopreservation of gametes and embryos has been presented as a viable alternative for preserving fertility in cancer patients. However, it is not an option for pre-pubertal young people and patients who, for other reasons, need immediate treatment. In this context, the most appropriate protocol for these patients is cryopreservation of ovarian tissue and subsequent autotransplantation. However, cryopreservation is a technique that, despite being effective, still has limitations due to the high damage caused to follicular cells and oocytes, resulting from the formation of reactive oxygen species (ROS). Therefore, the present study aimed to evaluate the effects of the ethanolic extract of *Punica granatum L.* during vitrification of bovine ovarian tissue, verifying its antioxidant capacity, impacts on follicular morphology and ultrastructure. The activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) was also analyzed, in addition to the levels of thiol, malonaldehyde (MDA) and nitrite. For this, ovaries from 12 animals were used, which were fragmented and vitrified in the absence ( $\alpha$ -MEM; Sucrose; Dimethylsulfoxide and fetal bovine serum) or in different concentrations of the ethanolic extract of *Punica granatum L.* (10, 50 and 100 $\mu$ g/mL), for 5 days, followed by heating. The tissues were evaluated immediately after heating and also after being incubated in vitro for 24h. For statistical analyses, the Shapiro-Wilk normality test was performed, followed by two-way analysis of variance (ANOVA), with Tukey post-hoc. Qualitative data were evaluated by chi-square ( $\chi^2$ ) using Graphpad Prism 9.0 (Graphpad Software, Inc., San Diego, USA). Statistical significance was considered when the results presented a probability of occurrence of the null hypothesis of less than 5% ( $P < 0.05$ ). As a result, it was observed that the addition of 10  $\mu$ g/mL of *Punica granatum L.* ethanolic extract promoted the maintenance of follicular morphology after heating. However, this preservation was not observed in in vitro incubation, with a decrease in the number of normal follicles ( $P < 0.05$ ). On the other hand, it was possible to observe the maintenance of the density of stromal cells and the extracellular matrix (ECM). Furthermore, ultrastructural analysis demonstrated the degeneration of organelles present in vitrified follicles. When evaluating the redox profile, no significant differences were observed in the activity of the CAT and GSH-PX enzymes, in both periods evaluated. However, after 24h of incubation, the concentration of 10  $\mu$ g/mL promoted greater SOD activity. At the same time, maintenance of MDA levels was observed ( $P < 0.05$ ). In conclusion, the addition of 10  $\mu$ g/mL of *Punica granatum L.* ethanolic

extract maintained preserved follicular morphology, promoting an increase in the activity of antioxidant enzymes and reducing lipid peroxidation.

**Keywords:** Cryopreservation; Antioxidants; Cancer; Ovary

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Anatomia ovariana; ovário com folículos em diferentes estágios de desenvolvimento, corpos lúteos e albicans..... 16

### CAPITULO 1

- Figura 1 – Percentual de folículos normais em (a), área de densidade do estroma (b) em tecido ovariano bovino na ausência (controle fresco e  $\alpha$ -MEM) ou presença de diferentes concentrações (10, 50 e 100  $\mu$ g/mL) do extrato etanólico de *Punica granatum L.*, depois de vitrificado (VIT) e incubado (INC). Percentual de folículos primordiais e em desenvolvimento (c) nos diferentes grupos incubados. Imagens representativas da densidade do estroma no controle fresco (d) 10-VIT (e) e 10-INC (c)..... 41
- Figura 2 – Morfologia ultraestrutural de folículos pré-antrais no controle fresco (A),  $\alpha$ -MEM vitrificado (B), 10  $\mu$ g/mL vitrificado (C) e 10  $\mu$ g/mL incubado (D). Pode-se observar a presença de Células da granulosa (GC), Oócito (O), Núcleo (NU), Ribossomos (R), Retículo endoplasmático (ER), Mitocôndria (M), Complexo de golgi (C.Golgi), Vacúolos (V), Gotas lipídicas (li), Grandes vacúolos (\*), Destacamento (#), Cromatina fragmentada (+)..... 43
- Figura 3 – Percentual de fibras de colágeno tipo I (A) e tipo III (B) em tecido ovariano bovino na ausência (controle fresco e  $\alpha$ -MEM) ou presença de diferentes concentrações (10, 50 e 100  $\mu$ g/mL) do extrato etanólico de *Punica granatum L.* depois de vitrificado (VIT) e incubado (INC). Imagens representativas das fibras de colágenos no controle fresco (c) 10-VIT (d) e 10-INC (e)..... 44
- Figura 4 – Atividade das enzimas antioxidantes (A) SOD, (B) CAT e (C) GSH-Px em tecido ovariano bovino na ausência (controle fresco e  $\alpha$ -MEM) ou presença de diferentes concentrações (10, 50 e 100  $\mu$ g/mL) do extrato

	etanólico de <i>Punica granatum L.</i> depois de vitrificado (VIT) e incubado (INC).....	45
Figura 5	– Conteúdo de TIOL (A), MDA (B), e níveis de NO <sup>2-</sup> em tecido ovariano bovino na ausência (controle fresco e α-MEM) ou presença de diferentes concentrações (10, 50 e 100 µg/mL) do extrato etanólico de <i>Punica granatum L.</i> depois de vitrificado (VIT) e incubado (INC).....	46
Figura 6	– Determinação da atividade antioxidante total do extrato etanólico puro da casca de <i>Punica granatum L.</i> , através dos métodos de captura de radicais livres DPPH (A) e ABTS (B).....	47

## LISTA DE QUADROS

Tabela 1 – Efeitos da <i>Punica granatum L.</i> em diferentes sistemas fisiológicos.....	19
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido ascórbico
ABTS	2,2'- azino-bis (3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid
ACPS	Agentes crioprotetores
APAF-1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
BAX	<i>BCL2 Associated X</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BMP-15	<i>Bone morphogenetic protein 15</i>
BSA	<i>Bovine sérum albumine</i>
CA <sup>+</sup>	Cálcio
CAT	Catalase
D0	Dia zero
DMSO	Dimetilsufóxido
DPPH	5,5'-ditiobis- (ácido 2-nitrobenzóico)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EG	Etilenoglicol
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ETOH	Etanol
FBS	<i>Fetal bovine sérum</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
GDF-9	Fator de diferenciação de crescimento 9
GPX	Glutathiona peroxidase
GR	Glutathiona redutase
GSH	Glutathiona reduzida
H <sub>2</sub> O	Água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
ISCB	Instituto superior de ciências biomédicas
Kh <sub>2</sub> po <sub>4</sub>	Fosfato monopatássico
LABIEX	Laboratório de bioquímica e expressão gênica
LH	Hormônio luteinizante
MCF-7	<i>Michigan Cancer Foundation-7</i>
MDA	Malondialdeído

Me <sub>2</sub> SO	Dimetilsulfóxido
Na <sup>+</sup>	Sódio
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NOX1	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 1</i>
NRF1	<i>Nuclear Respiratory Factor 1</i>
NRF2	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
NTB2	2-nitro-5-thiobenzoate
P53	<i>Tumor protein 53</i>
PG	<i>Punica granatum L.</i>
INC	Incubado
PGC1- $\alpha$	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>
CGPs	Células germinativas primordiais
PrOH	1,2-propanodiol
SOD	Superóxido dismutase
TCM-199	<i>Tissue culture medium 199</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
UECE	Universidade Estadual do Ceará
UFC	Universidade Federal do Ceará
$\alpha$ -MEM	<i>Minimum essencial medium alpha modification</i>



## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
$\alpha$	Alfa
$\mu$	Micro

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	15
2.1	Aspectos gerais da formação e desenvolvimento dos folículos ovarianos.....	15
2.1.1	<i>Atresia folicular</i> .....	17
2.2	Criopreservação de tecido ovariano .....	19
2.2.1	<i>Agentes crioprotetores</i> .....	20
2.3	Estresse oxidativo.....	21
2.4	Utilização de antioxidantes na vitrificação de tecido ovariano.....	22
2.4.1	<i>Punica granatum L.</i> .....	23
3	JUSTIFICATIVA .....	27
4	HIPÓTESE.....	29
5	OBJETIVOS .....	29
5.1	Objetivo geral .....	29
5.2	Objetivos específicos .....	29
6	CAPITULO 1: Potencial antioxidante da <i>Punica granatum L.</i> durante a vitrificação de tecido ovariano bovino.....	30
7	CONCLUSÃO.....	64
8	PERSPECTIVAS .....	64
	ANEXOS .....	65
	REFERÊNCIAS.....	66

## 1 INTRODUÇÃO

Avanços recentes na terapia do câncer aumentaram significativamente a sobrevida das pacientes. Entretanto, também aumentaram, conseqüentemente, os quadros de insuficiência ovariana induzidas pelo tratamento (Siegel; Miller; Jemal, 2020), chegando à incidência alarmante de 1,0 - 1,5% em mulheres com menos de 40 anos (Hewlett, 2015; Qin, 2015). Dessa forma, a criopreservação surge como uma alternativa para a manutenção da fertilidade feminina, uma vez que possibilita a conservação de diferentes tipos de células e tecidos, incluindo tecido ovariano, oócitos e embriões. Neste contexto, esta biotécnica poderá evitar a falência ovariana prematura, em decorrência de procedimentos de radioterapia e/ou quimioterapia (Dos Santos Morais *et al.*, 2019). No entanto, ainda se tem uma limitação para pacientes pediátricos e pacientes que não podem passar pelo processo de estimulação ovariana (Fan *et al.*, 2021). Nestes casos, o armazenamento de gametas e embriões não é considerado uma opção, sendo a criopreservação de tecido ovariano, seguida de transplante, a única técnica disponível.

Essa abordagem não só permite a preservação e a restauração da fertilidade feminina em pacientes adultas e pré-púberes, mas também facilita a restauração da função endócrina com a retomada do eixo hipotálamo-hipófise-gônada (Rodrigues *et al.*, 2021). Sendo a criopreservação realizada de duas formas, através do congelamento lento ou rápido (vitrificação). A técnica de vitrificação é amplamente utilizada pela praticidade, simplicidade e eficácia, pois atua impedindo a formação dos grandes cristais de gelo que podem causar danos às membranas celulares.

A técnica de vitrificação pode ser prejudicial às organelas, como as mitocôndrias e o retículo endoplasmático rugoso que podem ser gravemente afetados durante esse processo, apresentando inclusive inchaço na célula devido ao desequilíbrio iônico que ocorre nas membranas (Borges *et al.*, 2009). Além disso, a técnica pode ocasionar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) o que compromete a viabilidade celular, resultando em danos ao DNA (Ñaupás *et al.*, 2021). Estas lesões comprometem o potencial de desenvolvimento folicular e oocitário, e, conseqüentemente, a competência de formação de um embrião (Silva *et al.*, 2018).

Outro ponto importante é a etapa de aquecimento do tecido após o período de armazenamento. Neste momento, tem-se um aumento nos níveis de EROs, uma vez que o oxigênio é reintroduzido nas células, causando reações de oxidação e redução

que levam à formação de radicais livres (Rocha *et al.*, 2018). Desta forma, o uso de antioxidantes não enzimáticos, de origem vegetal, vem crescendo consideravelmente devido a sua capacidade de atuar direto ou indiretamente no sistema antioxidante celular, ocasionando a redução da vacuolização tecidual que é gerada pelo processo de vitrificação no tecido ovariano (Brito *et al.*, 2013).

Dentre uma grande diversidade de bioprodutos de origem vegetal, com potencial antioxidante, podemos destacar a *Punica granatum L.*, também conhecida como romã, pertencente à família Lythraceae, sendo nativa da Índia e hoje em dia cultivada em regiões tropicais e subtropicais, incluindo o Brasil. A romã é conhecida por seu potencial antioxidante, atuando na redução do estresse oxidativo (Ammar *et al.*, 2017), no alívio da hipertensão (Sun *et al.*, 2016), além de efeito positivo durante a isquemia ovariana (Yala *et al.*, 2018) e no dano testicular induzido por tramadol, um analgésico da classe dos opioides (Minisy *et al.*, 2020).

Este fruto também proporcionou aumento da integridade e viabilidade da membrana plasmática no sêmen resfriado e congelado de bovinos (Javed *et al.*, 2019). Apesar de resultados promissores nos diferentes sistemas fisiológicos utilizando a romã, ainda não se tem relatos na literatura do seu efeito durante a vitrificação de tecido ovariano bovino.

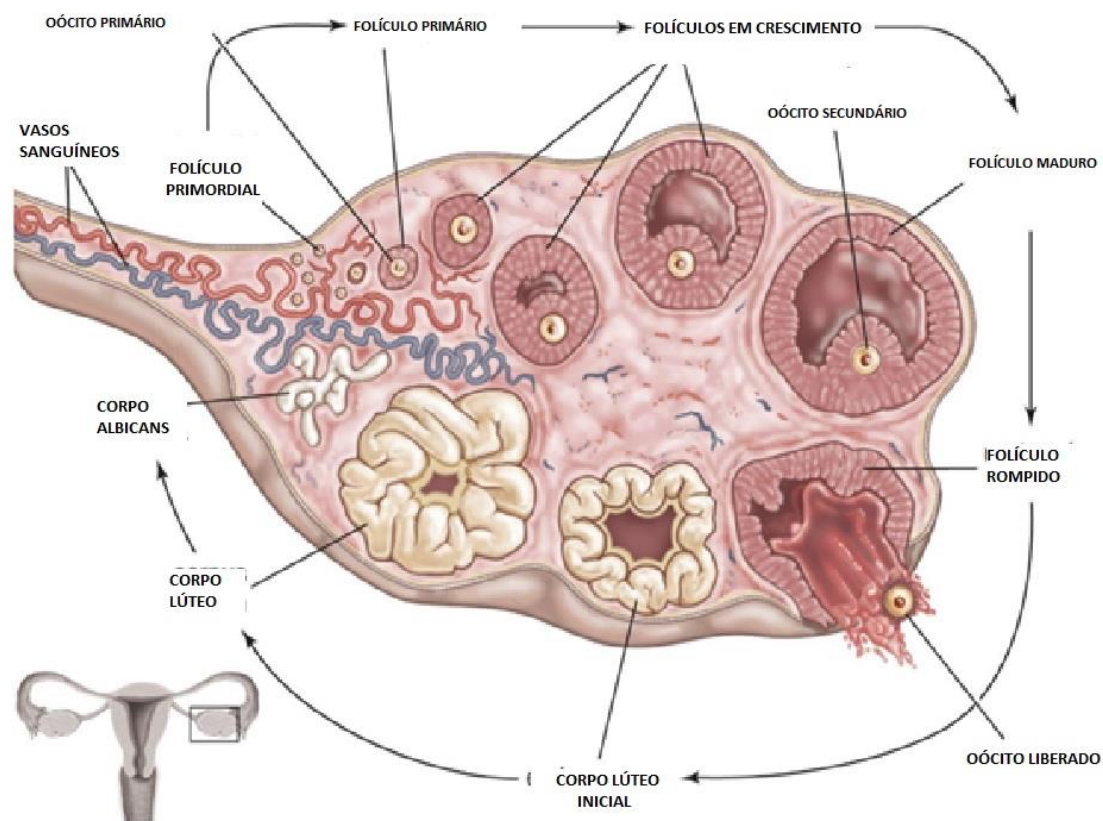
## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Aspectos gerais da formação e desenvolvimento dos folículos ovarianos

A estrutura ovariana é similar entre as espécies de mamíferos, possuindo uma região medular, constituída por tecido conjuntivo, nervos, artérias e veias, e uma região cortical, que contém corpos lúteos, albicans e folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento (Leitão *et al.*, 2018).

O ovário é responsável pelo desenvolvimento, maturação e liberação de oócitos, além da síntese e secreção de hormônios que são essenciais para o desenvolvimento folicular, manutenção do trato reprodutivo e suas respectivas funções (Araújo *et al.*, 2014). Desta forma, o folículo ovariano é considerado a unidade morfofuncional do ovário, tendo na maioria das espécies o início do seu desenvolvimento durante a fase fetal com a formação dos folículos primordiais (Hsueh *et al.*, 2015)

Durante o desenvolvimento embrionário, as células germinativas primordiais (CGPs) migram para as cristas gonadais, onde, por influência das células somáticas circundantes, se desenvolvem em espermatócitos ou oócitos. Durante o desenvolvimento do ovário, as CGPs passam por diversas divisões mitóticas até tornarem-se oogônias (Varnoy *et al.*, 2017). E então ocorre a formação dos folículos primordiais, onde um oócito primário, estacionado na prófase da meiose I, é circundado por uma única camada de células da pré-granulosa pavimentosa, envolvidos por uma membrana basal. Estes folículos constituem o *pool* de reserva, folículos quiescentes, que serão recrutados para entrar na fase de crescimento (Araújo *et al.*, 2014).



**Figura 1:** Anatomia ovariana; ovário com folículos em diferentes estágios de desenvolvimento, corpos lúteos e albicans.

**Fonte:** Adaptado de Utiger, Robert D, 2023.

Logo, então, os folículos primordiais se desenvolvem em folículos primários. O folículo e o oócito crescem em diâmetro com o surgimento de matriz extracelular e zona pelúcida; as células foliculares pavimentosas se diferenciam formando a primeira camada de células cuboides, denominada de granulosa. Os folículos primários continuam seu crescimento com sucessivas divisões mitóticas das células da granulosa, e tornam-se folículos secundários com, pelo menos, duas camadas de células da granulosa. Além disso, as células da granulosa recrutam as células circundantes do estroma ovariano para formarem uma camada adicional de células somáticas, com formato pavimentoso, que envolve o folículo, denominada de teca (Berne; Levy, 2004).

Após a puberdade, com a maturação do eixo hipotálamo-hipófise-gônada resultando na liberação pulsátil de hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), tem-se o início e a manutenção da ciclicidade menstrual/estral e a ativação dos folículos primordiais, iniciando o desenvolvimento de folículos antrais. Durante a formação dos folículos antrais, os folículos secundários continuam a crescer

em tamanho, tornando-se folículos terciários (antral), onde possuem alta proliferação celular (granulosa e teca), dando início a formação do antro, uma cavidade repleta de fluido folicular, fruto do metabolismo das células da granulosa. O fluido folicular é composto por hormônios esteróides, proteínas, anticoagulantes, enzimas e eletrólitos, algo similar à composição do soro sanguíneo (Bahr, J.M., 2018).

Os folículos antrais adquirem aumento significativo do diâmetro folicular e oocitário e expansão da cavidade antral. No último estágio de desenvolvimento folicular, o folículo pré-ovulatório é constituído por um oócito secundário circundado por células da granulosa, denominadas de células do cumulus (Leitão *et al.*, 2018), onde, sob influência dos hormônios gonadotróficos, libera um oócito em metáfase II apto a ser fertilizado. Estima-se que, a cada mil folículos recrutados, apenas um chegue a ovular, o que representa uma perda significativa da reserva ovariana.

### **2.1.1 Atresia folicular**

O processo de morte folicular é regulado por uma linha tênue entre os sinais de sobrevivência que incluem fatores endócrinos e intra ovarianos, com a ação de citocinas, fatores de crescimento, esteróides gonadais e a morte celular (Craig *et al.*, 2007) que ocorre durante toda a vida reprodutiva da fêmea. Embora alguns folículos desenvolvem-se até o estágio pré-ovulatório, com um oócito fertilizável, a maioria destes (99,9%) sofrem atresia (Zhou; Peng; Mei, 2019). A ovulação ou atresia folicular depende da expressão de fatores que promovem o crescimento, diferenciação ou apoptose das células foliculares (Craig *et al.*, 2007). Na maioria dos casos esse processo resulta na morte do folículo, o que ocasiona uma baixa significativa na reserva ovariana. No entanto, ainda assim, trata-se de um evento importante para a homeostase e a manutenção da ciclicidade ovariana. Nos folículos, esse processo de morte celular pode ocorrer por um processo degenerativo, denominado de apoptose ou por necrose (Celestino *et al.*, 2018)

A apoptose é um processo dependente de energia, cuidadosamente regulado e caracterizado por alterações morfológicas e bioquímicas específicas, nas quais a ativação das caspases desempenha um papel central. Ocorre normalmente durante o desenvolvimento e envelhecimento, como um mecanismo homeostático para manter as populações celulares nos tecidos, podendo ser acionada como um mecanismo de defesa ou quando as células são danificadas por doenças ou agentes nocivos (Elmore, 2007).

Uma das vias mais importantes no processo de apoptose é a via dependente de mitocôndrias. Em condições normais, as proteínas da família Bcl-2 encontram-se em um estado de equilíbrio, com a presença de proteínas pró-apoptóticas e proteínas anti-apoptóticas. Quando a célula sofre uma lesão celular, por exemplo, pode haver um desequilíbrio dessas proteínas, tendendo ao aumento das proteínas pró-apoptóticas. Essas proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2, fazem com que o citocromo C seja liberado da mitocôndria. O citocromo C ativa e une-se ao Apaf-1 (Fator ativador de protease apoptótica), e esse complexo Citocromo C + Apaf-1 ligam-se ao CARD (Domínio de Recrutamento de Caspases), e esses 3 formam o complexo apoptossomo. O apoptossomo, vai ativar as caspases iniciadoras ou ativadoras de morte celular, sendo que, dessas caspases iniciadoras, a principal é a caspase 9, que vai dar início ao processo de morte, as caspases iniciadoras ativam as executoras, no geral a caspase 3, e essa por sua vez ativa a endonuclease, que é a enzima que promove a fragmentação do DNA, além da degradação do citoesqueleto. (Zoheir *et al.*, 2021).

Além disso, a apoptose tem características singulares como: condensação irreversível da cromatina, fragmentação do DNA e do núcleo, além do encolhimento celular devido à condensação do citoplasma (Araújo; Celestino; Chaves, 2021). Já a necrose é caracterizada pela progressiva perda de citoplasma, núcleo picnótico e rápido influxo de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{H}_2\text{O}$ , resultando no inchaço da célula, o qual ocasionará a fragmentação da célula e a liberação de conteúdo intracelular para o meio extracelular, gerando inflamação (Bhatia, 2004).

No entanto, apesar de distintas, pode-se destacar como indutores comuns da necrose e apoptose o estresse oxidativo (Abedpour; Salehnia; Ghorbanmehr, 2018). Sendo assim, a atresia folicular pode ser caracterizada como um processo natural que causa a morte e reabsorção de um ou mais folículos, antes de concluírem o seu processo de maturação, sendo a apoptose a forma mais comum de morte celular fisiológica (Araújo; Celestino; Chaves, 2021).

Os mecanismos que envolvem o processo de morte folicular ainda não foram bem definidos. Entretanto, sabe-se que ele pode ser desencadeado por diferentes eventos, dependendo da molécula que ative o processo de apoptose. No trabalho de Chaube *et al.* (2014), utilizando o extrato das folhas de Neem (*Azadirachta indica L.*) em folículos ovarianos, observaram a inibição da atividade da catalase que resultou no aumento de  $\text{H}_2\text{O}_2$  dentro do folículo. O aumento nos níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  induziu a



apoptose das células da granulosa através da via mediada por mitocôndrias-caspases. A apoptose das células da granulosa levou ao rompimento das junções comunicantes e interrompeu a sinalização das células do cumulus para o oócito, ocasionando a redução dos níveis de 17- $\beta$  estradiol, privando o oócito dos fatores de crescimento e nutrientes. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> também entrou diretamente no oócito e desencadeou a apoptose nos oócitos (Chaube *et al.*, 2014). Esses mecanismos podem ser inerentes a diferentes moléculas, o que pode auxiliar na busca por ferramentas que atenuem os efeitos de substâncias nocivas à saúde reprodutiva.

## 2.2 Criopreservação de tecido ovariano

Mulheres que apresentam disfunção ovariana e/ou falência ovariana prematura (FOP) não são capazes de liberar oócitos viáveis à fertilização, nem produzir níveis normais de hormônios (Gandolfi, 2019). Com o objetivo de prevenir os prejuízos decorrentes dos tratamentos oncológicos, a criopreservação de embriões, oócitos, folículos ou tecido ovariano (Sparks, 2015) tem sido uma opção viável para preservar as funções ovarianas.

A criopreservação do tecido, seguido de transplante ortotópico ou heterotópico (Chung *et al.*, 2023), é a única opção para pacientes que não estão elegíveis a realizar a estimulação ovariana necessária para o congelamento de oócitos ou embriões, como garotas pré-púberes. Dessa forma, a criopreservação é uma técnica biotecnológica para preservação a longo prazo, estando já está bem estabelecida para células isoladas. No geral, as células são criopreservadas e armazenadas em freezer a -80°C ou em nitrogênio líquido a -196°C (Ishizaki *et al.*, 2023).

A técnica pode ser realizada de duas maneiras: utilizando o congelamento lento ou a vitrificação. O congelamento lento é realizado por um equipamento responsável pela diminuição controlada de temperatura, a qual pode durar até 2 horas. Já no processo de vitrificação, o tecido é submetido à baixíssimas temperaturas de uma só vez, fazendo com que ele atinja o estado vítreo, impedindo a formação de cristais de gelo intra e extracelular, os quais exerceriam efeitos extremamente deletérios na célula que está sendo congelada (Abdelhafez *et al.*, 2010). Dessa forma, a vitrificação de tecido ovariano, seguido de transplante autólogo, tem apresentado resultados promissores na restauração da fertilidade em humanos e animais (Souza *et al.*, 2021).

### **2.2.1 Agentes crioprotetores**

A principal limitação no processo de criopreservação ocorre em função do congelamento da água intracelular. Esse fenômeno resulta na formação de cristais de gelo que destroem as células por ações mecânicas. Nesse caso, a vitrificação apresenta uma alternativa ao dano celular induzido pelo congelamento, levando a solidificação da água ao estado vítreo, algo semelhante ao vidro, sem formação de cristais de gelo (Marcantonini *et al.*, 2022). Entretanto, ainda assim, se tem um estresse osmótico e oxidativo, sendo necessária a adição de outros agentes crioprotetores (ACPs) para atenuar esses efeitos.

Os ACPs foram desenvolvidos para prevenir os danos físicos às células, induzidos por cristais de gelo que são formados sob temperaturas extremamente baixas. Porém, há um limite para a quantidade de ACPs que podem ser utilizadas devido a sua citotoxicidade, sendo este o principal impedimento à criopreservação por vitrificação (Best, 2015).

Os ACPs podem ser classificados em dois grupos, os permeáveis à membrana celular e os não permeáveis. Os ACPs permeáveis possuem tamanho pequeno, o que facilita sua penetração nas membranas celulares, interagindo com a água através de ligações de hidrogênio. Essa interação vai diminuir o ponto de congelamento da água, aumentando a sua viscosidade, ocasionando uma diminuição da quantidade de moléculas de água. Estas, não estarão disponíveis para interagir entre si e formar cristais de gelo (Whaley *et al.*, 2021). Os ACPs permeáveis mais utilizados nos protocolos de criopreservação são o etilenoglicol (EG), o glicerol e o dimetilsulfóxido (DMSO) (Ishizaki *et al.*, 2023).

No entanto, a depender da sua concentração, exercem efeito citotóxico na célula. O DMSO, por exemplo, quando utilizado em alta concentração durante a criopreservação de tecido ovariano apresentou sinais de toxicidade celular, afetando as mitocôndrias que se apresentaram disformes com a matriz rompida e restos de cristas. Também foi observado a vacuolização e inchaço da matriz extracelular nas células foliculares, e as células do estroma apresentaram a cromatina condensada, organelas mal preservadas e numerosos vacúolos em seu citoplasma (Leonel *et al.* 2019).

Ainda assim, outros autores relatam que o DMSO possui características importantes para o processo de criopreservação, como a capacidade de diminuir a firmeza e aumentar a fluidez das membranas celulares (Best, 2015). Dessa forma, a

associação de outros ACPs, junto ao DMSO tem demonstrado ser uma alternativa promissora para a criopreservação. Foi visto que ao utilizar a solução de vitrificação acrescida de DMSO, 1,2-propanodiol (PrOH) e EG, o tecido apresentou melhor qualidade, com maior preservação de folículos ovarianos (Sheikhi *et al.*, 2013). Desse modo, a sinergia entre a ação de diferentes ACPs parece proporcionar um melhor ambiente de vitrificação.

A segunda categoria de crioprotetores são os ACPs não permeáveis. Como o nome sugere, eles não permeiam, intracelularmente, a célula, portanto exerce sua influência fora dela. Esses agentes possuem maior peso molecular e atuam retirando a água livre e levando à desidratação do espaço intracelular por efeito osmótico. Nesta classe, os agentes mais utilizados são o polietileno glicol (PEG), polivinilpirrolidona (PVP) e açúcares (Whaley *et al.*, 2021); sendo, os açúcares, um dos primeiros e mais utilizados até hoje durante o processo de criopreservação.

A adição de açúcares ajuda a regular a pressão osmótica e evita a formação de cristais de gelo. Dissacarídeos, como a sacarose e trealose, são comumente utilizados em diferentes protocolos de vitrificação (Rajan *et al.*, 2018). A sacarose, quando utilizada em baixas concentrações, apresentou melhora na motilidade de espermatozoides equinos (Pérez-Marín *et al.*, 2018). Entretanto, oócitos em VG de búfalos, quando vitrificados em solução isenta de sacarose, apresentaram uma melhora nas taxas de maturação nuclear após a maturação *in vitro* (El-Shalofy *et al.*, 2020).

Dessa forma, fica evidente que a utilização de ACPs é indispensável no processo de criopreservação para evitar a formação de cristais de gelo. No entanto, na mesma proporção em que exercem seus efeitos positivos, algumas limitações são observadas. A principal delas a citotoxicidade que ocasiona um outro fator preocupante que é o desequilíbrio redox, levando ao estresse oxidativo em virtude de uma maior concentração de espécies reativas de oxigênio. Sendo estes fatores o que norteia a busca de compostos que atuem em sinergia com os ACPs, atenuando tais limitações.

### **2.3 Estresse oxidativo**

Quando presentes em baixas concentrações, as espécies reativas de oxigênio (EROs) desempenham função importante na manutenção da homeostase celular. Entretanto o excesso de EROs causa disfunção celular, peroxidação de proteínas e

lipídios, danos ao DNA levando inclusive a danos irreversíveis e morte (Van der Pol et al., 2019). Aproximadamente 95% do oxigênio é consumido pelas células em forma de energia e transformado em água. No entanto os 5% restantes produzem metabólitos chamados de espécies reativas de oxigênio, que são extremamente reativos (Hybertson et al., 2011).

O estresse oxidativo ocorre devido a um desequilíbrio entre moléculas pró-oxidantes e antioxidantes, resultando em alterações na atividade enzimática do sistema de defesa antioxidante, composto pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GSH-Px) (Furtado et al., 2021). A redução do oxigênio em água ocorre através da cadeia respiratória mitocondrial em um elétron de cada vez. Entretanto na cadeia de transporte de elétrons, podem vaziar elétrons para o oxigênio, reduzindo parcialmente esta molécula formando o ânion superóxido (Turrens; 2003). Nesse contexto, a SOD atua na transformação do ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, sendo este último clivado por CAT e GSH-Px para liberar água e oxigênio

Embora a biologia dos radicais livres tenha historicamente centrado no radical superóxido, considerado o mais produzido pelos sistemas fisiológicos, é crucial reconhecer a importância de outros processos, como a peroxidação lipídica. Este último processo, propagado por uma reação em cadeia de radicais livres, destaca-se como igualmente significativo (Hybertson et al., 2011). A peroxidação lipídica é um processo sob qual os oxidantes, como os radicais livres, atacam lipídicos com a inserção de oxigênio resultando em radicais lipídicos peroxil, podendo ser desencadeada de forma não enzimática ou enzimática. Os lipídios peroxidados, ao sofrerem decomposição, podem gerar produtos como malonaldeído (MDA) e que podem ser reconhecidos como corpos estranhos, resultando em dano oxidativo (Campos Petean et al., 2008).

#### **2.4 Utilização de antioxidantes na vitrificação de tecido ovariano**

Os agentes crioprotetores clássicos são usados para reduzir os danos ocasionados durante a criopreservação de amostras biológicas. Apesar dos ACPs não terem papel direto na formação de EROs, estes podem induzir sua produção. Assim, uma opção viável é suplementar os meios de vitrificação, aquecimento e cultivo com antioxidantes que possam melhorar a sobrevivência do tecido ovariano criopreservado (Afzali et al., 2023).

A utilização de resveratrol na solução de vitrificação melhorou a eficácia do autotransplante de tecido ovariano de camundongo, após o aquecimento, por meio de mecanismos anti-inflamatórios e antioxidantes. O que proporcionou um aumento da taxa de sobrevivência folicular e redução do apoptose folicular (Wang *et al.*, 2021).

Compostos, como o anetol e a rubina, apresentaram efeitos positivos durante a vitrificação de tecido ovariano ovino, proporcionando a preservação dos folículos pré-antrais e das células do estroma, além de reduzir os níveis de EROs e manter a atividade mitocondrial no tecido vitrificado após aquecimento (Dos Santos Morais *et al.*, 2019).

A utilização de antioxidantes também pode promover uma *up-regulation* na expressão de genes relacionados ao desenvolvimento folicular. O retinol, quando utilizado na vitrificação de folículos pré-antrais isolados de búfalos, apresentou uma *up regulation* de BMP-15 que promove a maturação folicular desde os folículos primordiais, e do GDF-9 que atua na diferenciação de células da granulosa (Gupta *et al.*, 2021; Sanfins *et al.*, 2018). Evidenciando que a utilização de substâncias com potencial antioxidante, durante o processo de criopreservação de tecido ovariano, vem tornando-se uma alternativa promissora.

#### **2.4.1 *Punica granatum L.***

A *punica granatum L.* é uma espécie de pequenas árvores, nativa de vários países asiáticos, como o Irã e o norte da Índia. A árvore e seus frutos são divididos em vários compartimentos anatômicos como sementes, casca, folhas, flores e raízes, sendo cada uma dessas estruturas ricas em moléculas bioativas com atividades terapêuticas (Moga *et al.*, 2021).

Os compostos bioativos da romã exercem atividades que atenuam os efeitos deletérios ocasionados por diversas patologias, nas mais diversas situações. Esses efeitos podem ser atribuídos a presença de compostos bioativos presentes nos extratos de romã, podendo citar especialmente, punicalagina e o ácido elágico (Viladomiu *et al.*, 2013). A Tabela a seguir demonstra os efeitos benéficos dos extratos de romã, nos diferentes sistemas fisiológicos.

Quadro 1. Efeitos da *Punica granatum L.* em diferentes sistemas fisiológicos.

REFERÊNCIA	TÍTULO	CONCLUSÕES
------------	--------	------------

El-Ashmawy, <i>et al.</i> , 2016.	Efeito do extrato de casca de romã nas alterações neoplásicas do fígado em ratos: mais do que um antioxidante	Os resultados indicaram um efeito profilático do extrato de romã contra alterações neoplásicas no fígado, o que foi evidenciado pela diminuição do tamanho do tumor, índice hepático e da proteína antiapoptótica Bcl-2; além do aumento dos níveis de glutathiona.
Deng <i>et al.</i> , 2017.	O extrato da casca de <i>Punica granatum</i> (romã) induz apoptose e prejudica a metástase em células do câncer de próstata	O extrato etanólico atuou induzindo a apoptose das células do câncer de próstata. Ocasionalmente perdendo o potencial mitocondrial, levando a um acúmulo de espécies reativas de oxigênio. Aumentou a proporção de expressão de Bax / Bcl2 e a ativação do executor de apoptose caspase 3.
Dikmen <i>et al.</i> , 2011.	Potência antioxidante de <i>Punica granatum L.</i> a casca da fruta reduz a proliferação celular e induz apoptose nas células do câncer de mama	O extrato metanólico exibiu efeitos antiproliferativos e apoptóticos em células de câncer de mama (MCF-7). Com base nos resultados, foi sugerido que o extrato atua na via apoptótica-mitocondrial em células MCF-7.
Ibrahim <i>et al.</i> , 2021	Papel do extrato de romã na restauração da expressão e proliferação do receptor de andrógeno endometrial em um modelo de rato de síndrome do ovário policístico	O extrato de romã, melhorou a SOP que acompanha as alterações histológicas do endométrio por meio de seus efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, antifibróticos, antiproliferativos e antiandrogênicos, muito provavelmente devido ao seu conteúdo de polifenóis.

Mollazadeh <i>et al.</i> , 2016	Efeitos do óleo de semente de romã nos marcadores de estresse oxidativo, parâmetros bioquímicos séricos e achados patológicos no rim e no coração de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina	O óleo das sementes de romã apresentou efeito protetor contra complicações do diabetes em ratos, com aumento da creatinina sérica e ureia, LDL, triglicerídeos, níveis de glicose, e redução dos níveis de MDA em tecido renal e cardíaco.
Noori <i>et al.</i> , 2016.	O suco de romã previne o desenvolvimento de doença hepática gordurosa não alcoólica em ratos, atenuando o estresse oxidativo e a inflamação	O consumo regular do suco de romã preveniu o desenvolvimento de doença hepática gordurosa não alcoólica mesmo na presença de outros fatores de risco como obesidade, hipercolesterolemia e alta ingestão de energia, gordura e açúcar.
Yayla, 2018.	Potencial efeito terapêutico do óleo de semente de romã na lesão de isquemia / reperfusão ovariana em ratos	PSO demonstrou um importante efeito terapêutico no tratamento da isquemia ovariana e lesão de reperfusão, diminuindo os níveis de estresse oxidativo, aumentando a expressão de TNF- $\alpha$ e NOX1, aumentando a eficácia do sistema de defesa antioxidante, e prevenindo a apoptose no tecido.

Os polifenóis possuem efeitos benéficos à saúde, prevenindo danos ao DNA e reduzindo a peroxidação lipídica (Lee *et al.*, 2010). O extrato de romã possui em sua composição polifenóis como elagitaninos e galotaninos (punicalina, punicalagina,

pedunculagina, punigluconina, granatina B e telimagrandina I). Destaca-se a punicalagina como componente majoritário, onde relatos na literatura a descrevem com o potencial antioxidante, além de efeito protetor na aterosclerose (Alalawi *et al.*, 2023), atuando na redução da hepatotoxicidade e promovendo *up regulation* do NRF2 que atua na proteção contra lesões induzidas por EROs (AL-Khawalde *et al.*, 2022).

Além da punicalagina, o extrato de romã possui outras substâncias com forte potencial terapêutico. O ácido elágico, por exemplo, descrito na literatura como uma molécula antioxidantes e anti-inflamatória. Demonstrou ser eficaz contra a toxicidade hepática induzida por ácido valpróico, normalizando os níveis de biomarcadores hepáticos e reduzindo as alterações bioquímicas ocasionadas pela lesão tecidual (Elyamany *et al.*, 2020); preveniu, ainda, alterações no sistema cardiovascular, ocasionadas por doxorrubicina (Salinger-Martinovic *et al.*, 2021). Em ratos diabéticos, o ácido elágico atenuou a atrofia muscular, melhorando a disfunção mitocondrial através do aumento da expressão de NRF-1 e PGC-1 $\alpha$ , diminuindo a apoptose (Liu *et al.*, 2022).



### 3 JUSTIFICATIVA

Apesar dos tratamentos contra o câncer terem evoluído nas últimas décadas, muitas mulheres submetidas à quimioterapia/radioterapia perdem a capacidade reprodutiva, desenvolvendo menopausa precoce, insuficiência ovariana prematura e infertilidade devido ao tratamento. Nos dias atuais, a criopreservação de oócitos e embriões representa uma das alternativas mais simples a ser seguida para preservar a fertilidade desses pacientes, resultando em bons números de nascidos vivos.

No entanto, muitas pacientes não podem realizar a terapia hormonal, como mulheres com câncer de mama, por exemplo. Isto se deve à necessidade de ingestão de altos níveis de estradiol, o que pode influenciar de forma negativa a sua saúde da mulher, aumentando a proliferação das células cancerígenas na mama. Além disso, também podemos destacar as mulheres pré-púberes, que são um subgrupo único da população, pois geralmente são jovens demais e ainda não iniciaram as alterações hormonais referentes a puberdade e à maturação do eixo hipotálamo-hipófise-gônada, o que impede a criopreservação de seus gametas de forma isolada.

Para esses dois grupos, as opções geralmente se limitam à criopreservação de tecido ovariano, seguida de transplante, o que tem se mostrado como uma alternativa promissora, com a possibilidade de retomada da atividade gonadal e possível nascimento de prole saudável. Durante o processo de criopreservação de tecido ovariano, ocorre uma perda significativa na população folicular saudável, de modo que, ao aquecer e transplantar o tecido, o número de folículos normais e saudáveis é significativamente menor quando comparado ao material fresco. Alguns fatores influenciam nesse processo, como a formação de cristais de gelo e aumento nos níveis de EROs, o que ocasiona deformação na morfologia e ultraestrutura das células foliculares. Já nos oócitos, há o aumento de vacuolização e a degradação da membrana mitocondrial (Leonel *et al.* 2019). Estes pontos estimulam os pesquisadores a buscar cada vez mais maneiras de atenuar esses danos, otimizando a biotécnica e garantindo melhor eficiência durante todo o processo.

A utilização de compostos de origem vegetal com potencial antioxidante é uma alternativa promissora a ser incorporada nas soluções de vitrificação. Substâncias como resveratrol (Wang *et al.*, 2021), anetol e rubina (Dos Santos Moraes *et al.*, 2019), e retinol (Grupta *et al.*, 2021) são descritas na literatura como substâncias que atuam em sinergia com os agentes crioprotetores, promovendo a manutenção da estrutura

folicular devido à diminuição dos níveis de ERO e a *up regulation* de genes envolvidos no desenvolvimento folicular. Dessa maneira, fica evidente que a utilização de antioxidante, durante as etapas de criopreservação pode ser uma importante ferramenta para melhorar a sobrevivência do tecido, garantindo uma retomada mais eficiente da atividade metabólica da gônada após o transplante.

Nesse contexto, a *Punica granatum L* é descrita na literatura pela sua alta capacidade antioxidante, atuando na redução dos níveis de EROs (Ammar *et al.*, 2017) e diminuindo lesões oxidativas (AL-Khawalde *et al.*, 2022). Assim, o estudo dos mecanismos de ação do extrato da *Punica granatum L* durante a criopreservação é de fundamental importância, pois certamente fornecerá novas alternativas para controlar o estresse oxidativo e aumentar a eficiência do desenvolvimento folicular e maturação oocitária.

A obtenção de material biológico humano para utilização na pesquisa experimental é bastante limitada. Dessa forma, o modelo bovino surge como alternativa, visto que se aproxima mais da espécie humana em termos de fisiologia reprodutiva e características macroscópicas, como tamanho e consistência dos ovários. Além da similaridade fisiológica, como o período de foliculogênese, por se tratar de uma espécie mono-ovulatória, e com período de gestação semelhante. Todos esses pontos contribuem para a validação do modelo bovino em estudos envolvendo a fisiologia ovariana.

## **4 HIPÓTESE**

A adição do extrato etanólico de *Punica granatum L.* à solução de vitrificação de tecido ovariano mantém a integridade folicular do tecido vitrificado, reduzindo a produção de espécies reativas de oxigênio e promovendo melhora na retomada do metabolismo

## **5 OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito de diferentes concentrações do extrato etanólico de *Punica granatum L.* durante a vitrificação de tecido ovariano bovino.

### **5.2 Objetivos específicos**

- Mensurar o potencial antioxidante do extrato etanólico de *punica granatum L*
- Avaliar a morfologia e integridade folicular do tecido vitrificado e incubado.
- Mensurar os efeitos do extrato sobre o perfil redox do tecido vitrificado e incubado.
- Verificar a manutenção do estroma e da matriz extracelular ovariana.

## 6 CAPÍTULO 1

### **Potencial antioxidante da *Punica granatum L.* durante a vitrificação de tecido ovariano bovino**

(Antioxidant potential of *Punica granatum L.* during vitrification of bovine ovarian tissue)

**Periódico:** Cell and Tissue Research (Artigo a ser submetido)

(ISSN: 0302-766) Qualis: A1, Impact Factor: 4.061

## Potencial antioxidante da *Punica granatum L.* durante a vitrificação de tecido ovariano bovino

Solano Dantas Martins<sup>1</sup>, Maria Alice Felipe Oliveira<sup>1</sup>, Francisco das Chagas Costa<sup>2</sup>,  
Venância Antonia Nunes Azevedo<sup>2</sup>, Sônia Nair Baó<sup>4</sup>, José Roberto Viana Silva<sup>2</sup>,  
Vânia Marilande Ceccatto<sup>7</sup>, Valdevane Rocha Araújo<sup>\*,1,5</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGB), Universidade Federal do Ceará (UFC), Avenida Comandante Maurocéllo Rocha Ponte, 100, CEP 62.041-040, Sobral, CE, Brasil

<sup>2</sup> Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia da Reprodução (LABIREP), Universidade Federal do Ceará, Av. Maurocéllo Rocha Ponte 100, CEP 62.041-040, Sobral, CE, Brasil

<sup>3</sup> Laboratório de Bioquímica e Expressão Gênica (LABIEX), Instituto Superior de Ciências Biomédicas (ISCB), Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

<sup>4</sup> Laboratório de Microscopia e Microanálise, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.

<sup>5</sup> Curso de Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAr), Avenida São Sebastião, 2.819, CEP: 64.202-020, Parnaíba, PI, Brasil

\*Endereço correspondente:

Curso de Ciências Biológicas (CCBio)

Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAr). Av. São Sebastião, 2819, Campus Ministro Reis Velloso, Parnaíba/PI, Brasil, CEP: 64.202-020, Telefone: +55.85.998024842

Email: valdevane.araujo@gmail.com

### RESUMO

Este estudo teve como objetivos (1) avaliar os efeitos da utilização do extrato etanólico da casca do fruto de *Punica granatum L.* (EE-PG) durante a vitrificação de tecido ovariano bovino sobre a manutenção da morfologia e integridade ultraestrutural dos folículos ovarianos, densidade estromal e das fibras de colágeno tipo I e tipo III, além de (2) avaliar o perfil redox através da quantificação da atividade das enzimas

superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GSH-Px). Para isso, fragmentos do córtex ovariano bovino foram vitrificados em diferentes concentrações de EE-PG (10, 50 e 100 µg/mL) e armazenados em nitrogênio líquido durante 5 dias. Logo após o aquecimento, parte do material biológico foi destinado às análises e o restante foi incubado durante 24 h para avaliação da retomada do metabolismo. Como resultados, observou-se que a concentração de 10 µg/mL manteve a morfologia folicular apenas logo após o aquecimento, sem que o mesmo fosse observado após incubação por 24h. Por outro lado, após a incubação, 10 µg/mL foi capaz de reduzir os efeitos deletérios ocasionados pela vitrificação nas organelas celulares. Além disso, esse mesmo tratamento aumentou a atividade da enzima SOD, manteve os níveis de malonaldeído (MDA) e da densidade das células do estroma, semelhantes ao controle fresco. Em conclusão, esse estudo demonstra que a utilização de 10 µg/mL de EE-PG, pode ser eficaz, quando adicionada a solução de vitrificação de tecido ovariano.

**Palavras-chave:** Cancer, antioxidantes, *Punica granatum L.*, Vitrificação, Ovário

## 1 INTRODUÇÃO

Ao longo das últimas décadas a taxa de mortalidade em decorrência de patologias como o câncer vem diminuindo consideravelmente (Siegel *et al.*, 2023), devido à maior eficácia dos novos tratamentos oncológicos. No entanto, tratamentos com rádio ou quimioterapia podem prejudicar a fertilidade (Del-Pozo-Lérida *et al.*, 2019). Isso se manifesta através de amenorreia, insuficiência ovariana e, em muitos casos, leva a uma menopausa precoce. Adolescentes e mulheres jovens são especialmente afetadas, perdendo assim a capacidade reprodutiva (Tiong *et al.*, 2014).

Nesse contexto, as biotecnologias da reprodução surgem como uma possível alternativa. Seus constantes avanços podem contribuir também para a tentativa de minimizar os prejuízos ocasionados pelo câncer e seu tratamento. A realização de protocolos de estimulação ovariana é comum em pacientes oncológicas (Akel *et al.*, 2020). Este procedimento possibilita a criopreservação de oócitos e/ou embriões. No entanto, para pacientes pré-púberes ou que necessitam de tratamento imediato, essa opção pode não ser viável devido ao tempo necessário para os protocolos de

estimulação, além da ausência de maturidade do eixo sexual. Para esses grupos de pacientes, uma alternativa é a realização da criopreservação do tecido ovariano, seguida de autotransplante após a remissão do câncer, pois a reserva ovariana estará preservada (Gamzatova et al, 2014). A criopreservação pode ser realizada através do congelamento lento ou da vitrificação. A vitrificação apresenta vantagens em relação ao congelamento lento, sendo a principal delas o fato de evitar a formação de cristais de gelo intracelulares (Lee et al., 2019).

Embora amplamente utilizada, a principal limitação da vitrificação é o fato de utilizar altas concentrações de crioprotetores, os quais podem ser citotóxicos (Zhang et al., 2009). Dentre os efeitos citotóxicos, destaca-se o desequilíbrio iônico nas membranas e degeneração das organelas (Borges et al., 2009), tornando as células mais sensíveis as espécies reativas de oxigênio (EROs) (Guerin et al., 2001). Considerando a ocorrência destes efeitos no ambiente ovariano, tais condições podem gerar danos ao DNA, comprometendo o desenvolvimento folicular e oócario (Silva et al., 2018; Ñaupas et al., 2021;).

Para atenuar estes efeitos deletérios, várias substâncias de origem vegetal com potencial antioxidante vêm sendo utilizadas. Tais compostos podem retardar a oxidação de proteínas, carboidratos, lipídios e DNA (Sindhi et al., 2013). Dentre essas substâncias, a *Punica granatum L.* popularmente conhecida como romã, vem ganhando destaque por possuir um alto potencial antioxidante (Ammar et al., 2017). O suco de *Punica granatum L.* quando adicionado à solução de vitrificação manteve a viabilidade e a integridade da membrana plasmática de espermatozoides bubalinos (Javed et al., 2019) e bovinos (El-Sheshtawy; El-Sisy; El-Nattat; 2016).

Assim, o objetivo do presente estudo foi verificar: (1) o potencial antioxidante do extrato etanólico da casca de *Punica granatum L.* e (2) avaliar os seus efeitos na solução de vitrificação, analisando os seguintes parâmetros: (i) manutenção da morfologia e ultraestrutura folicular, (ii) alterações na matriz extracelular e na densidade do estroma; (iii) avaliação do perfil redox do tecido vitrificado e incubado in vitro, através da mensuração da atividade das enzimas SOD, CAT e GSH-Px, e a (iv) quantificação dos níveis de Tiol, nitrito e MDA.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Princípios éticos e locais de execução**

O presente estudo foi realizado no Laboratório de cultivo de células e tecidos da Universidade Federal do Ceará – Campus de Sobral, assim como no Laboratório de Bioquímica e expressão gênica (LABIEX), vinculado ao Instituto Superior de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual do Ceará (UECE), e no Laboratório de microscopia e microanálise da Universidade de Brasília. O estudo foi realizado em conformidade os princípios éticos da experimentação em pesquisa animal, submetendo-se ao Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará, sendo aprovado sob o protocolo de nº 31032.002523/2023- 41

### **2.2 Produção do extrato etanólico (EtOH)**

A casca do fruto da *Punica granatum L.* foi retirada de frutas frescas e maduras, oriundas do mercado local. A fruta foi higienizada e para realização da extração etanólica, 150 g da casca foi colocada em etanol P.A durante 5 dias. Após a extração, a solução foi levada a um rotoevaporador para retirar o solvente utilizado na extração e produzir um concentrado do extrato somente com os componentes extraídos (Nascimento *et al.*, 2018). Após essa última etapa, o extrato foi liofilizado e diluído em água ultra-pura, nas concentrações de 10, 50 e 100 µg/mL (Seeram *et al.*, 2005).

### **2.3 Coleta dos ovários**

Ovários (n = 24) de vacas cíclicas adultas, sem raça definida, foram coletados em abatedouro local (Sobral, Ceará, Brasil). Imediatamente após o abate e os ovários lavados em etanol 70% por cerca de 10 segundos, seguidos de mais duas lavagens em solução salina (0,9%) acrescida de 100 µg/mL de penicillina e estreptomicina. Os ovários serão transportados para o laboratório em solução salina 0,9% com antibióticos em até 1 h, a 4 °C (Chaves *et al.*, 2008).

### **2.4 Vitrificação e aquecimento de tecido ovariano**

A vitrificação e o descongelamento seguiram a metodologia descrita por Brito *et al.* (2018) com algumas modificações. Inicialmente, os fragmentos foram alocados (n=2) em poços contendo 2 mL de solução de vitrificação, composto por  $\alpha$ -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 0,25 M de sacarose, 10% de



dimetilsulfóxido (Me<sub>2</sub>SO) e diferentes concentrações do extrato etanólico de *Punica granatum* (10, 50 e 100 µg/mL). Após 5 minutos de exposição à solução de vitrificação, os fragmentos foram vitrificados em uma superfície sólida. Nesse processo, uma das superfícies de uma placa metálica foi colocada em contato direto com nitrogênio líquido, enquanto os fragmentos de tecido ovariano foram colocados em contato com o outro lado da superfície. Finalmente, os fragmentos de tecido ovariano foram acondicionados individualmente em criotubos e armazenados em nitrogênio líquido (-196 °C).

Após 5 dias de armazenamento, as amostras foram aquecidas. Para isso, os criotubos foram expostos à temperatura ambiente (25 °C) por 1 minuto e; então, imersos rapidamente em banho-maria à 37°C. Após o aquecimento, os fragmentos foram lavados em 2 mL de α-MEM suplementado com 10% de FBS e concentrações decrescentes de sacarose (0,5 M, 0,25 M, 0 M) durante 5 minutos, cada. Os fragmentos foram avaliados após vitrificados e incubados por 24 h.

## **2.5 Cultivo dos fragmentos de córtex ovariano**

Para avaliar a capacidade de desenvolvimento folicular e manutenção da integridade da MEC, após a vitrificação, 2 fragmentos por tratamento foram incubados in vitro por 24 h, em placas de cultura de 24 poços (Carvalho *et al.*, 2011) em α-MEM (pH 7,2 – 7,4) suplementado com BSA (1,25 mg/mL), glutamina (2 mM), hipoxantina (2 mM), penicilina/estreptomicina (100 µg/mL), insulina (10 µg/mL), transferrina (5,5 µg/mL) e selênio (10 µg/mL). O meio de cultura foi estabilizado a 38,5 °C, 5% de CO<sub>2</sub> no ar, por 4 horas antes do uso.

## **2.6 Análise de morfologia e desenvolvimento folicular por histologia clássica**

A análise histológica foi executada de acordo com a metodologia de Bizarro-Silva *et al.* (2018), com modificações. Imediatamente após a coleta dos ovários (D0), bem como após o término dos períodos de experimento em cada tratamento, os fragmentos foram fixados em paraformaldeído por 12 h e destinados à histologia clássica. Para tanto, foi realizada a desidratação dos fragmentos em concentrações crescentes de etanol, diafanização utilizando xilol e inclusão em parafina histológica. Os fragmentos incluídos em blocos de parafina foram seccionados, seriadamente, à espessura de 7 µm; e a cada 5 secções foram montadas lâminas, as quais serão coradas pelo método de hematoxilina-eosina. Somente foram analisados os folículos

pré-antrais cujos oócitos apresentarem o núcleo evidente na secção observada para evitar dupla contagem. As lâminas foram identificadas por códigos anônimos para evitar análise subjetiva e foram examinadas em microscópio (Nikon, TS 100, Japão) com ampliação de 100 e 400 x. A avaliação da ativação e crescimento folicular foi realizada pela quantificação dos folículos nas diferentes classes foliculares de desenvolvimento: primordiais (oócito central rodeado por uma camada de células da granulosa achatadas) e folículos em crescimento (primários: oócito central rodeado por uma camada de células da granulosa cuboidais, e secundários: oócito central com duas ou mais camadas de células da granulosa cuboidais) (Hulshof *et al.*, 1994). Esses folículos foram, então, classificados como normais quando apresentaram um oócito intacto, células da granulosa organizadas em uma ou mais camadas e sem núcleo picnótico; e como degenerados quando apresentaram oócito retraído, núcleo picnótico e/ou circundado por células das granulosas desorganizadas, destacadas da membrana basal (Hulshof *et al.*, 1994). Foram considerados no mínimo 30 folículos por animal (5x30=150). Os percentuais de folículos primordiais e em desenvolvimento saudáveis foram calculados antes e após o cultivo, em cada um dos tratamentos, nos dois experimentos

## **2.7 Avaliação da densidade celular do estroma ovariano**

As lâminas coradas com hematoxilina-eosina foram utilizadas para avaliação da densidade celular do estroma ovariano, a qual foi realizada antes (controle fresco) e após aquecimento e incubação de 24 h nos diferentes tratamentos. Feita de forma manual, realizando a contagem do núcleo celular em um total de 10% de todos os cortes histológicos. Quatro campos aleatórios (50 × 50 µm = 2500 µm<sup>2</sup>) por secção foram capturados utilizando microscópio Nikon E200 com câmera acoplada (Nikon, Coolpix 4500), com magnificação de 400×. Essas imagens foram utilizadas para calcular a densidade média de células estromais por fragmento ovariano. As fotos foram avaliadas por apenas um operador utilizando o software ImageJ (ALVES *et al.*, 2016).

## **2.8 Análise da matriz extracelular (MEC) em tecido ovariano**

Para avaliar as fibras colágenas da matriz extracelular do córtex ovariano, foi realizada a coloração com Picrosirius Red (Kit Abcam) seguindo a metodologia descrita por Rittié (2017), com modificações. Resumidamente, seções ovarianas de 7

µm foram desparafinadas em xilol e incubadas em solução de Sirius Red (0,1%) por 1 h, em temperatura ambiente. Em seguida, o excesso de corante foi removido com solução de ácido acético (0,5%) e as secções, então, desidratadas e submetidas à montagem de lâmina. As imagens foram obtidas com diferenças nas cores de polarização, sendo as fibras de colágeno do tipo I (birrefringência corada em amarelo/laranja) e III (birrefringência corada em verde) (Junqueira *et al.*, 1978), utilizando microscopia de luz polarizada em microscópio Nikon E200 com câmera acoplada (Nikon, Coolpix 4500) e magnificação de 400×. Uma média de 50 cortes foram avaliados por tratamento. As imagens foram analisadas utilizando a medição do limiar RGB para obter as porcentagens das cores, expressas em pixels, utilizando o software ImageJ

## **2.9 Avaliação da morfologia ultraestrutural dos folículos pré-antrais**

A análise da ultraestrutura celular foi realizada com o auxílio de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para isto, pequenos fragmentos de tecido ovariano frescos, vitrificados e incubados foram fixados em uma solução contendo 2% de paraformaldeído e 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio (pH 7,2). Após fixação, os fragmentos foram mantidos em 5 mM de tampão cacodilato de sódio. Em seguida, as amostras foram desidratadas em acetona e embebidas em resina Spurr. Os cortes ultrafinos (60 nm) foram preparados quando o núcleo do oócito for observado no corte semifino (3 µm). Os cortes semifinos foram corados com azul de toluidina e avaliados em microscopia óptica, enquanto que os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados ao microscópio eletrônico de transmissão. A avaliação ultraestrutural foi aplicada para observação dos seguintes parâmetros: integridade das membranas basal e nuclear, morfologia e densidade das organelas citoplasmáticas do oócito e das células da granulosa, bem como o grau de vacuolização citoplasmática (Araújo *et al.*, 2010).

## **2.10 Análises bioquímicas.**

Os fragmentos ovarianos (100 mg mL<sup>-1</sup>) foram homogeneizados com tampão fosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; P9791 e P3786; Sigma-Aldrich; 1:9) acrescido de inibidores de protease (aprotinina 5 mg mL<sup>-1</sup> e Phenylmethanesulfonyl fluoride; PMSF; 34.8 mg mL<sup>-1</sup>) e pH 7,5. Os homogenatos de ovário foram centrifugados a 1500g, por 10 min, a 4 °C, e o sobrenadante coletado para uso nos

ensaios espectrofotométricos, descritos abaixo, usando cubetas de quartzo (Genesis 10s UV-vis; Thermo Scientific), conforme descrito anteriormente (Ellman 1959). Os dados são expressos como  $\pm$  s.e.m. unidade de enzima por miligrama de proteína (U/mg de proteína)

### **2.10.1 Proteínas totais (Método de Bradford)**

A concentração de proteína foi determinada usando o método de Bradford (1976). Este método usa Coomassie blue (Quick start/Bradford; Catálogo No. 500-0205; Bio-Rad) para determinar a concentração total de proteínas em cada amostra de extrato. Ao entrar em contato com proteínas, o corante azul de Coomassie forma um complexo e emite uma luminescência azul. A absorbância está diretamente relacionada à concentração de proteína da amostra e foi avaliada, espectrofotometricamente, em um comprimento de onda de 595 nm. A concentração de proteína total nas amostras foi determinada por meio de uma curva padrão, construída usando albumina bovina como padrão (0, 2,5, 5, 10, 15, 25, 35 e 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), e foi usada para padronizar os níveis de pró-oxidantes (tiol) e antioxidantes (SOD, CAT e GPx), conforme descrito a seguir

### **2.10.2 Determinação do status pró-oxidativo através do conteúdo de tiol**

O teor de tiol total foi determinado usando 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoic acid (DTNB; Dinâmica D8130) como um índice de tiol reduzido. Resíduos de tiol reagem com DTNB (10  $\mu\text{M}$ ), quebrando a ligação dissulfeto para formar o ânion 2-nitro-5-thiobenzoate ( $\text{NTB}^{2-}$ ) em pH neutro. O  $\text{NTB}^{2-}$  é quantificado em um espectrofotômetro medindo a absorbância a 412 nm, com resultados expressos como nMol de DTNB reduzido por miligrama de proteína (Takahashi et al. 1978).

### **2.10.3 Atividade da superóxido dismutase (SOD)**

A atividade da SOD foi medida como a inibição da auto-oxidação da adrenalina (Bannister e Calabrese 1987). A oxidação da adrenalina, na presença de CAT em meio básico, leva à formação do radical  $\text{O}_2$ , com o qual a SOD reage, retardando ('inibindo') a oxidação da adrenalina. A solução de CAT (0,048  $\text{mg mL}^{-1}$ ; c 9322; Sigma-Aldrich) foi realizada, adicionando (7:3) ao tampão glicina, pH 10,2 (Dinâmica). Três volumes diferentes (10, 20 ou 40  $\mu\text{L}$ ) de homogenato de ovário foram adicionados à solução e, em seguida, adrenalina (0,218  $\text{mg mL}^{-1}$ ; E4260; Sigma-Aldrich) foi adicionada para

iniciar a oxidação. A oxidação foi medida a 480 nm, a cada 10 s, por 180 s.

#### **2.10.4 Atividade da catalase (CAT)**

A atividade da CAT foi medida como o consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como substrato a 240 nm (Aebi 1984). Uma solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (152 µL mL<sup>-1</sup>; PH09717RA; Êxodo científica) e solução salina tamponada com fosfato (PBS; pH 7,4) foi misturada em uma cubeta de quartzo à temperatura ambiente e, em seguida, foram adicionados 50 µL do homogenato de ovário. A cada 30 s, o consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi medido duas vezes.

#### **2.10.5 Atividade da glutathiona peroxidase (GSH-px)**

A atividade da GPx foi medida pela oxidação de NADPH. O NADPH é consumido pela glutathiona redutase (GR; G3664; Sigma-Aldrich) para converter GSSG em GSH. Na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GPx oxida GSH a GSSG e reduz peróxidos a álcoois e água. O consumo de NADPH é diretamente proporcional ao consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e, conseqüentemente, à atividade de GPx (FLOHÉ; GÜNZLER, 1984). A reação foi preparada misturando 500 µL de tampão fosfato de potássio (100 mM), que é composto por 13,6 g L<sup>-1</sup> de fosfato de potássio monobásico (P0662; Sigma Aldrich) mais 1,86 g L<sup>-1</sup> EDTA (5 mM; E4884; Sigma-Aldrich; pH 7, 4) e 38 µg/mL<sup>-1</sup> GR, 3 µg/mL<sup>-1</sup> GSH e 100 µL de homogeneizado de ovário, e incubado por 10 min, em temperatura ambiente, para que a cisteína GPx pudesse entrar em contato com GR e GSH. Por fim, 100 µL de NADPH e, 120 s depois, 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram adicionados à mistura, e a oxidação de NADPH, medida como uma diminuição na absorbância de NADPH a 340 nm, foi avaliada a cada 10 s, por 300 s.

#### **2.10.6 Determinação da concentração de nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)**

A determinação dos níveis de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> foi realizada em duplicata por meio da reação de Griess. Foram adicionadas às amostras 100 µL de homogenato e 100 µL da solução de Griess (1% sulfonilamida em 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 0,1% NEED/ água destilada/ 1:1:1:1). A curva-padrão foi produzida a partir da diluição seriada de uma solução de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>). As leituras foram obtidas em A<sub>540</sub> nm, e os valores obtidos expressos em µM de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (Green *et al.*, 1982).

#### **2.10.7 Determinação da produção de substâncias ácidas reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

A quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico avalia o produto final da peroxidação lipídica da membrana, o malondialdeído (MDA). 63 µL de homogenato de tecido ovariano foram adicionados a 100 µL de ácido perclórico a 35%. As amostras foram centrifugadas a 5000 rpm, por 10 minutos a 4°C, em seguida, aquecidas a 95°C por 30 minutos. Ao final, 150 µL do sobrenadante foram adicionados a 50 µL de ácido tiobarbitúrico a 1,2%. As leituras foram obtidas em A<sub>535</sub> nm (Cighetti *et al.*, 1999).

## **2.11 Avaliação da capacidade antioxidante total do extrato etanólico de *Punica granatum L.***

Para mensuração da capacidade antioxidante foram realizados ensaios baseados na captura de radicais.

### **2.11.1 Captura do radical 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina- 6-ácido sulfônico) (ABTS)**

O ensaio utilizando ABTS foi realizado de acordo com a metodologia de Rufino *et al.*, (2007a) com adaptações. Alíquotas de 15, 30 e 60 µL de solução estoque (200 µg mL<sup>-1</sup>) do extrato foram transferidas para tubos de ensaios contendo 3 mL de solução de radical ABTS previamente preparada, obtendo-se uma concentração final de 1, 2 e 4 µg mL<sup>-1</sup> de extrato. Após seis minutos de agitação as amostras foram submetidas a leitura em espectrofotômetro na região do ultravioleta a 734 nm. na qual foi necessário converter os resultados em percentual de inibição da atividade antioxidante que foi expressa em CE<sub>50</sub> = µg mL<sup>-1</sup>. Todas as análises foram feitas em triplicata e repetidas a triplicata. Foi feito uma curva para cada análise com R ± 0,995.

### **2.11.1 Captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)**

O ensaio antioxidante pela captura do radical DPPH e a curva-padrão foram realizados segundo Rufino *et al.*, (2007b), com adaptações. O preparado do reagente e mistura reacional aconteceram em ambiente escuro. Alíquota de 10, 20, 40 e 80 µL de cada solução estoque (200 µg mL<sup>-1</sup>) foram adicionadas a 1990, 1980, 1960 e 1920 µL de solução metanólica de DPPH 0,06 mM, respectivamente, em tubos de ensaio distintos. As concentrações finais do extrato foram 1, 2, 4 e 8 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Todas as amostras foram feitas em triplicata e repetida nas mesmas condições. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro de UV, no comprimento

de onda de 517 nm, a cada minuto, até alcançar a estabilização do valor de absorbância. Metanol foi usado como branco, para calibrar o espectrofotômetro e um controle positivo foi realizado, utilizando ácido ascórbico. Os resultados das absorbâncias foram convertidos em percentual de inibição e expressos em  $CE_{50} = \mu\text{g mL}^{-1}$  de DPPH a regressão calculada individualmente para cada amostra junto a amostra de diclorometano com  $R=0,999$  e equação da reta  $Y=0,7263x-0,87$ .

## 2.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos em média das repetições e seu correspondente erro padrão da média. Os dados que não apresentaram distribuição normal, conforme o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, sofreram transformação logarítmica. Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) two-way, com post-hoc de Tukey, para comparação entre grupos. Os dados de classificação qualitativa foram expressos de acordo com a sua proporção e avaliados pelo método do qui-quadrado ( $\chi^2$ ), através do software Graphpad Prism 9.0 (Graphpad Software, Inc., San Diego, EUA). A significância estatística foi considerada quando os resultados apresentaram a probabilidade de ocorrência da hipótese nula menor que 5% ( $P<0,05$ ).

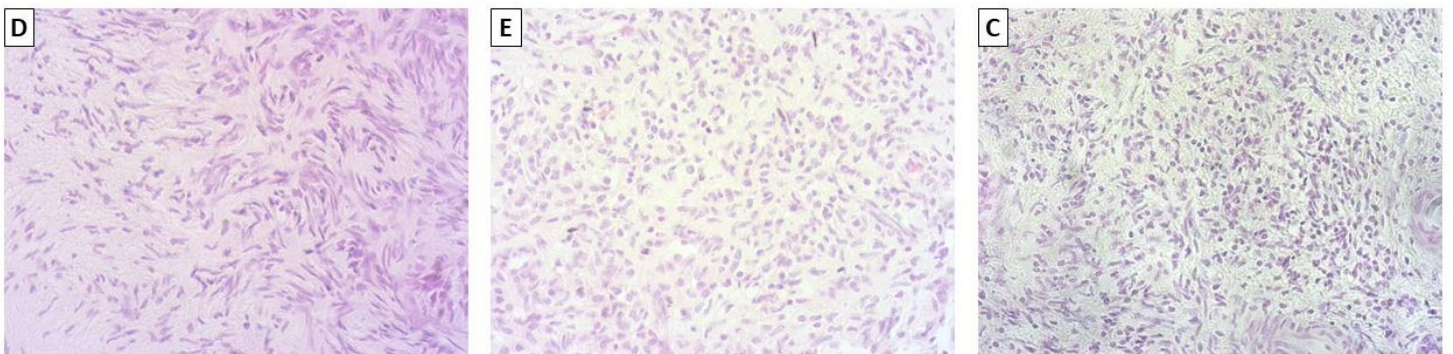
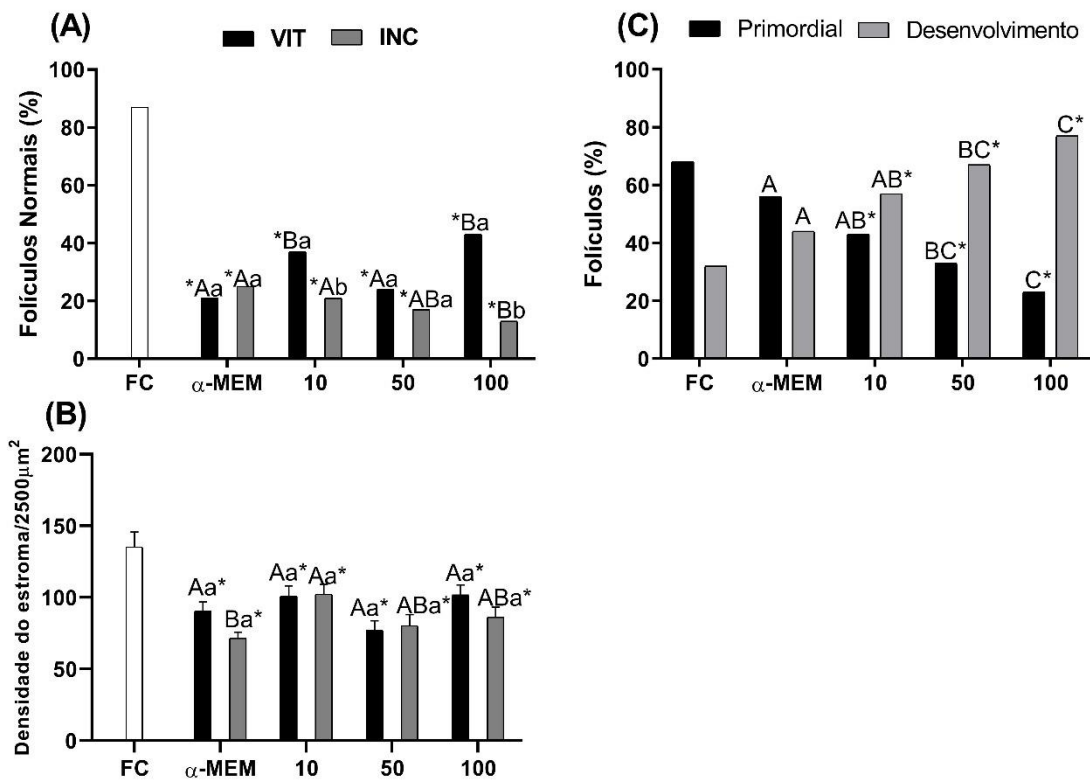
## 3 RESULTADOS

### 3.1 Avaliação morfológica após vitrificação e incubação por 24 h

A Figura 1 apresenta o percentual de folículos normais (A), densidade das células do estroma ovariano (B) e o percentual de folículos primordiais e em desenvolvimento (C) em tecido ovariano vitrificado ou incubado. Na Figura 1A, pode-se observar uma redução significativa do percentual de folículos normais em todos os grupos quando comparados ao controle fresco ( $P<0,05$ ). Quando vitrificados, a concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  proporcionou uma maior manutenção do número de folículos normais; no entanto, esse percentual reduziu de forma significativa após a incubação ( $P<0,05$ ).

A Figura 1B apresenta a área de densidade do estroma do tecido ovariano vitrificado ou incubado. Foi possível observar uma redução na densidade das células que compõem o estroma em todos os grupos quando comparado ao controle fresco ( $P<0,05$ ). Quando vitrificados, não foram observadas diferenças significativas. Entretanto, a concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  apresentou uma maior manutenção da densidade estromal após incubação ( $P<0,05$ ).

A Figura 1C apresenta o percentual de folículos primordiais no tecido ovariano incubado. Todos os grupos tratados com o extrato de *Punica granatum L.* diferiram de forma significativa do controle fresco quanto à taxa de ativação folicular e de folículos em desenvolvimento ( $P < 0.05$ ). Todas as concentrações proporcionaram maior taxa de ativação folicular, com destaque para a concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ , que resultou em menor percentual de folículos primordiais, seguido de um aumento de folículos em desenvolvimento ( $P < 0.05$ ).



**Figura 1:** Percentual de folículos normais em (a), área de densidade do estroma (b) em tecido ovariano bovino na ausência (controle fresco e  $\alpha$ -MEM) ou presença de diferentes concentrações (10, 50 e 100



$\mu\text{g/mL}$ ) do extrato etanólico de *Punica granatum L.*, depois de vitrificado (VIT) e incubado (INC). Percentual de folículos primordiais e em desenvolvimento (c) nos diferentes grupos incubados. Imagens representativas da densidade do estroma no controle fresco (d) 10-VIT (e) e 10-INC (c)

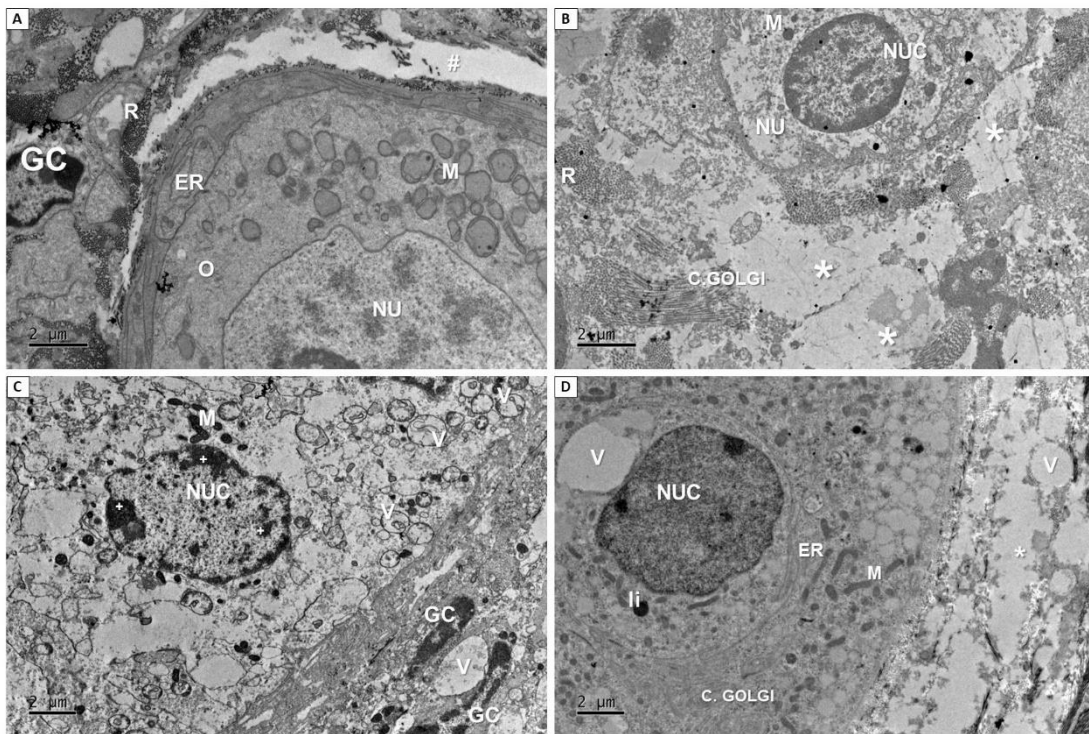
\* Diferenças significativas entre o controle fresco e demais tratamentos vitrificados e incubados  $P < 0.05$ .

<sup>ABC</sup> Letras diferentes representam diferenças significativas entre os diferentes tratamentos no mesmo período  $P < 0.05$ .

<sup>ab</sup> Letras diferentes representam diferenças significativas no mesmo tratamento em diferentes períodos  $P < 0.05$

### 3.2 Análise ultraestrutural

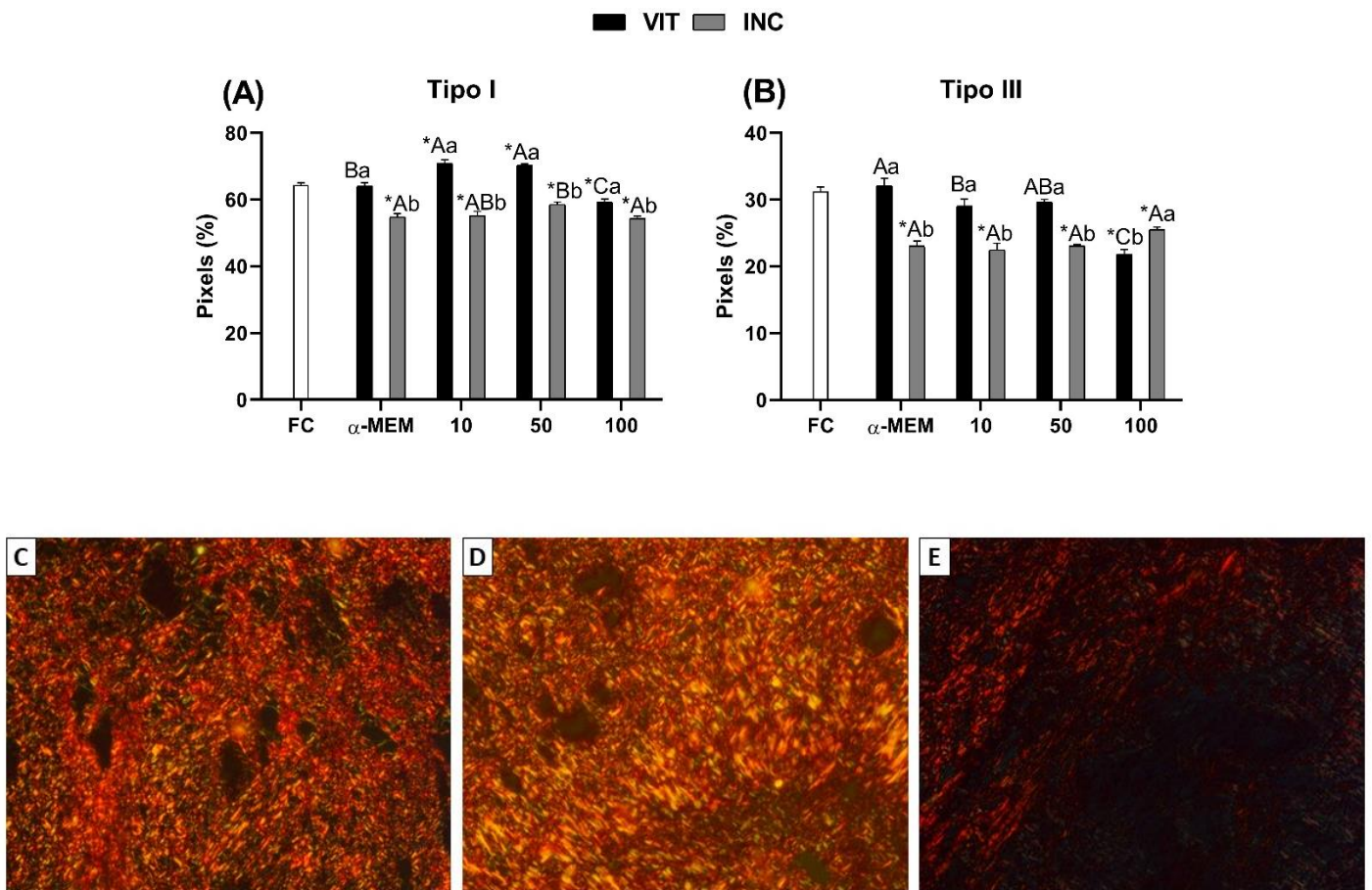
Os grupos que apresentaram maior manutenção da morfologia folicular na análise de histologia clássica foram selecionados para avaliação ultraestrutural. A Figura 2 apresenta a ultraestrutura dos folículos nos tratamentos previamente selecionados: controle fresco (A),  $\alpha$ -MEM vitrificado (B), 10  $\mu\text{g/mL}$  vitrificado (C) e 10  $\mu\text{g/mL}$  incubado (D). Pode-se observar a presença de um folículo normal no controle fresco (Fig. 2A), onde ocorre a manutenção da normalidade das células da granulosa, além de uma boa distribuição de organelas. Não foram observados vacúolos, e as estruturas celulares estão preservadas em todos os compartimentos foliculares, apesar de um destacamento que possivelmente possa ter sido ocasionado pelo processamento para MET. No grupo  $\alpha$ -MEM vitrificado (Fig. 2B), é possível identificar um folículo degenerado com a presença grandes vacúolos e espaços vazios. Algo semelhante foi observado nos folículos vitrificados na presença de 10  $\mu\text{g/mL}$  (Fig. 2C), apresentando um grande número vacúolos em toda a extensão do folículo. Pode-se observar fragmentação da cromatina, além de uma redução na densidade de organelas. A concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  após incubação, apesar da presença de vacúolos, o tecido aparenta estar mais preservado do que quando apenas vitrificado na mesma concentração. É possível observar uma melhor densidade e distribuição de organelas, incluído a presença de mitocôndrias, complexo de Golgi e retículo endoplasmático bem definidos.



**Figura 2:** Morfologia ultraestrutural de folículos pré antrais no controle fresco (a),  $\alpha$ -MEM vitrificado (b), 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  vitrificado (c) e 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  incubado (d). Pode-se observar a presença de Células da granulosa (GC), Oócito (O), Núcleo (NU), Ribossomos (R), Retículo endoplasmático (ER), Mitocôndria (M), Complexo de golgi (C.Golgi), Vacúolos (V), Gotas lipídicas (li), Grandes vacúolos (\*), Destacamento (#), Cromatina fragmentada (+).

### 3.3 Análise dos componentes da matriz extracelular (MEC)

A Figura 3 apresenta a avaliação dos diferentes componentes da matriz extracelular, demonstrando a mensuração das fibras de colágeno do tipo I (A) e tipo III (B) em tecido ovariano vitrificado ou incubado. A concentração de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de *Punica granatum L.* após vitrificação aumentou de forma significativa o percentual de fibras tipo I, seguido por uma redução no número de fibras do tipo III ( $P < 0.05$ ). No entanto, após incubação, a mesma concentração obteve uma redução significativa do percentual de ambas as fibras ( $P < 0.05$ ).



**Figura 3:** Percentual de fibras de colágeno tipo I (a) e tipo III (b) em tecido ovariano bovino na ausência (controle fresco e  $\alpha$ -MEM) ou presença de diferentes concentrações (10, 50 e 100  $\mu$ g/mL) do extrato etanólico de *Punica granatum L.*, depois de vitrificado (VIT) e incubado (INC). Imagens representativas das fibras de colágeno no controle fresco (c) 10-VIT (d) e 10-INC (e)

\* Diferenças significativas entre o controle fresco e demais tratamentos vitrificados e incubados  $P < 0.05$ .

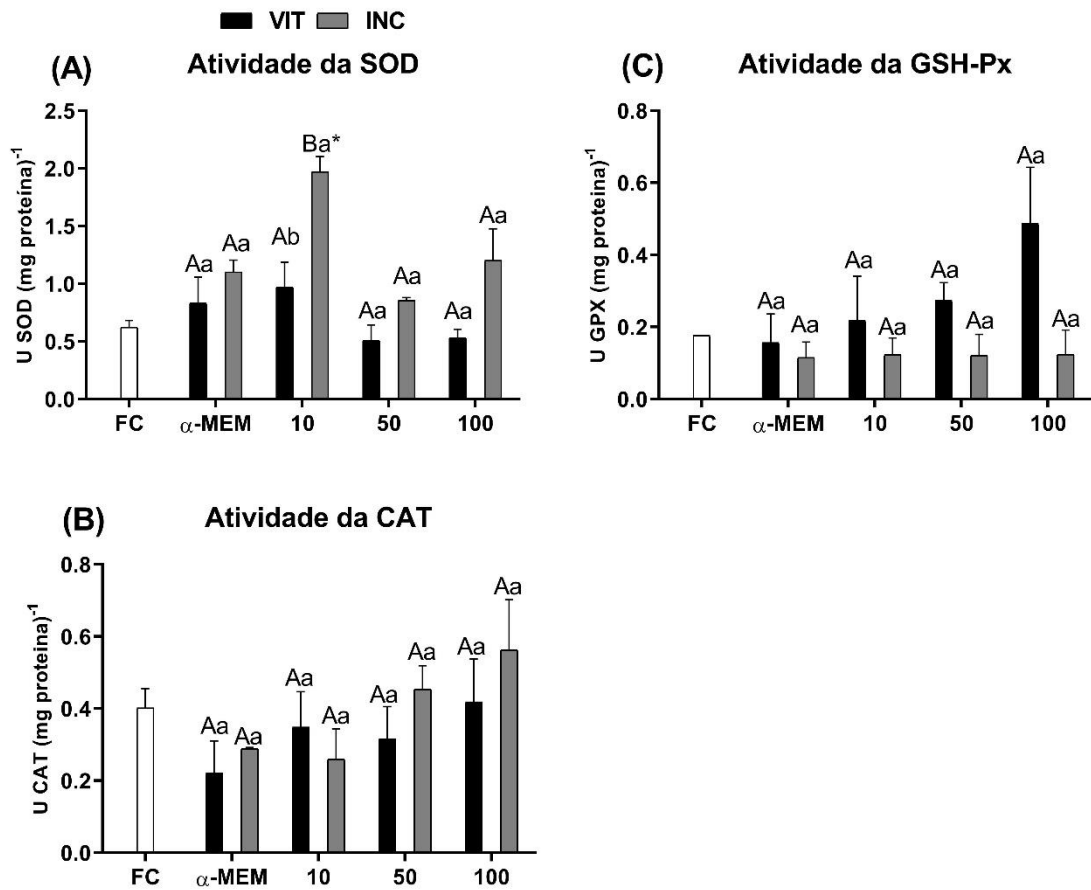
ABC Letras diferentes representam diferenças significativas entre os diferentes tratamentos no mesmo período  $P < 0.05$ .

ab Letras diferentes representam diferenças significativas no mesmo tratamento em diferentes períodos  $P < 0.05$

### 3.4 Mensuração da atividade das enzimas SOD, CAT e GSH-px

A Figura 4 apresenta a atividade das enzimas antioxidantes SOD (A), CAT (B) e GSH-px (C). Quando observado a atividade da enzima SOD é possível observar uma maior atividade na concentração de 10  $\mu$ g/mL após incubação quando comparado aos

demais grupos em ambos os períodos ( $P < 0.05$ ). No entanto, não foram observadas diferenças significativas na atividade das enzimas CAT e GSH-px em nenhum dos tratamentos ( $P > 0.05$ ).



**Figura 4:** Atividade das enzimas antioxidantes (a) SOD, (b) CAT e (c) GSH-px em tecido ovariano bovino na ausência (controle fresco e  $\alpha$ -MEM) ou presença de diferentes concentrações (10, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) do extrato etanólico de *Punica granatum L.*, depois de vitrificado (VIT) e incubado (INC).

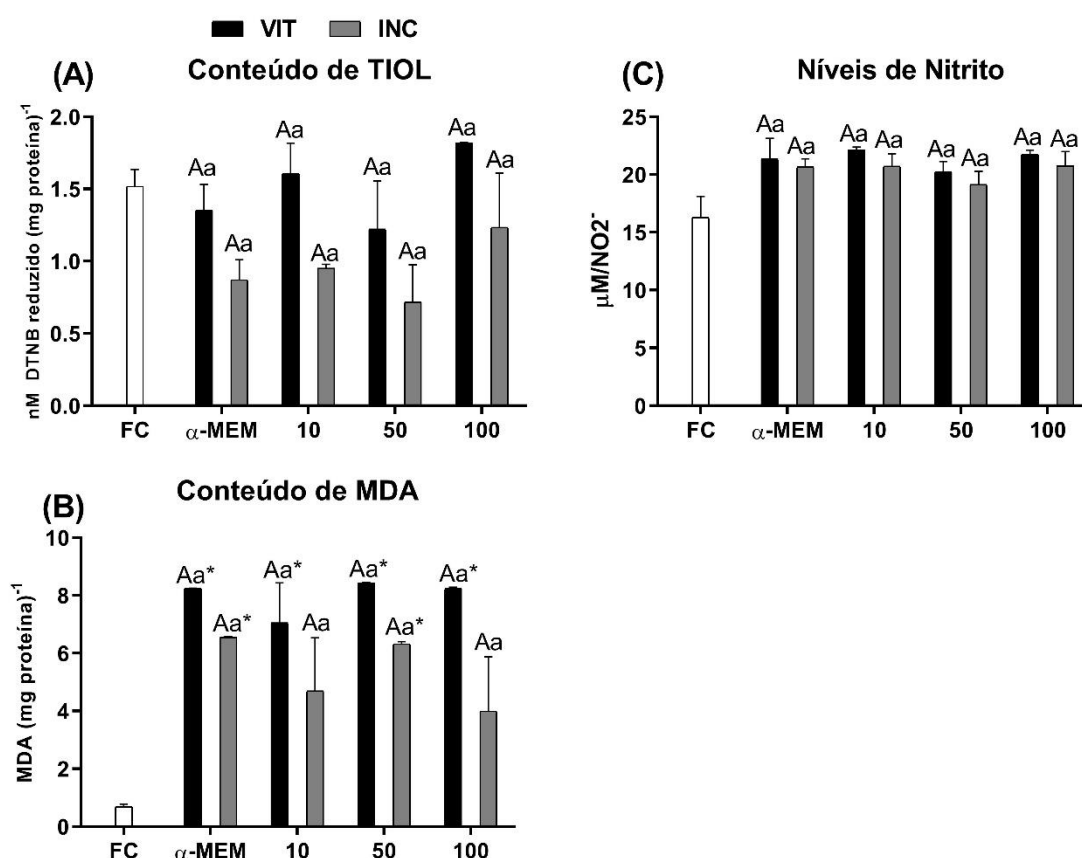
\* Diferenças significativas entre o controle fresco e demais tratamentos vitrificados e incubados  $P < 0.05$ .

<sup>ABC</sup> Letras diferentes representam diferenças significativas entre os diferentes tratamentos no mesmo período  $P < 0.05$ .

<sup>ab</sup> Letras diferentes representam diferenças significativas no mesmo tratamento em diferentes períodos  $P < 0.05$ .

### 3.5 Determinação do status pró-oxidante (tiol), conteúdo de malondialdeído (MDA) e níveis de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ )

A Figura 5 apresenta a mensuração dos resíduos de TIOL (A), níveis de malonaldeído (B) e nitrito (C) em tecido ovariano vitrificado ou incubado. A Figura 5A demonstra que não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos tratamentos. Na Figura 5B, é apresentado o conteúdo de malondialdeído. Pode-se observar que a concentrações de 10  $\mu\text{g/mL}$ , após incubação, manteve os níveis MDA semelhantes ao controle fresco. A Figura 5C apresenta os níveis de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), e não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos.



**Figura 5:** Conteúdo de TIOL (a), MDA (b) e níveis de  $\text{NO}_2^-$  (c) em tecido ovariano bovino na ausência (controle fresco e  $\alpha$ -MEM) ou presença de diferentes concentrações (10, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) do extrato etanólico de *Punica granatum L.*, depois de vitrificado (VIT) e incubado (INC).

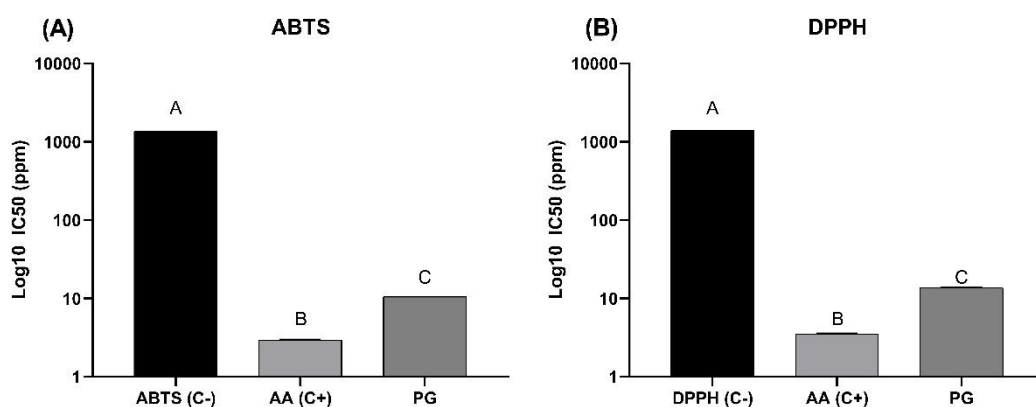
\* Diferenças significativas entre o controle fresco e demais tratamentos vitrificados e incubados  $P < 0.05$ .

<sup>ABC</sup> Letras diferentes representam diferenças significativas entre os diferentes tratamentos no mesmo período  $P < 0.05$ .

<sup>ab</sup> Letras diferentes representam diferenças significativas no mesmo tratamento em diferentes períodos  $P < 0.05$ .

### 3.6 Determinação da atividade antioxidante total do extrato etanólico de *Punica granatum L.*

A Figura 6 apresenta a atividade antioxidante total do extrato puro de *Punica granatum L.*, baseado no sequestro dos radicais DPPH (A) e ABTS (B). O extrato puro de *Punica granatum L.* demonstrou alta capacidade antioxidante, sendo semelhante ao ácido ascórbico (controle positivo).



**Figura 6:** Determinação da atividade antioxidante total do extrato etanólico puro da casca de *Punica granatum L.*, através dos métodos de captura de radicais livres (a) ABTS e (b) DPPH

ABC Letras diferentes representam diferenças significativas entre o controle negativo, positivo e o extrato puro de *Punica granatum L.*  $P < 0.05$ .

## 4 DISCUSSÃO

O presente estudo descreveu pela primeira vez os efeitos do extrato etanólico da casca de *Punica granatum L.* (EE-PG) durante a vitrificação de tecido ovariano bovino. Foi possível observar que, depois do processo de vitrificação e incubação, houve uma redução significativa no percentual de folículos morfologicamente normais em todas os tratamentos utilizados. Tais resultados foram confirmados pela presença de alterações ultraestruturais em todos os compartimentos foliculares, ou seja, células da granulosa e oócitos, comportamento observado em diferentes protocolos de criopreservação (Xing *et al.*, 2010; Jivago *et al.*, 2018; Mahmoudi *et al.*, 2021). Embora a vitrificação seja uma técnica simples e de baixo custo, sua principal desvantagem é a utilização de altas concentrações de crioprotetores, que ocasionam danos às células (Xing *et al.*, 2010; Cury-Silva *et al.*, 2021). O DMSO, crioprotetor utilizado em nosso estudo, é comum em soluções de vitrificação (Brito *et al.*, 2018; Costa *et al.*, 2021).

Devido a sua capacidade de formar poros na membrana celular para externalização da água (Gurtovenko; Anwar; 2007), sendo um processo importante para evitar a formação de cristais de gelo. No entanto, dependendo da concentração utilizada, além de induzir formação de poros, o DMSO provoca a ruptura das bicamadas lipídicas e a formação de vacúolos (Leonel *et al.*, 2019), sendo este último observado em nosso estudo. Dessa forma, torna-se necessária a elaboração de soluções de vitrificação com substâncias que atuem em sinergia com os crioprotetores, a fim de manter a viabilidade celular e preservar sua integridade ultraestrutural.

Nesse contexto, a utilização de 10 µg/mL do extrato na solução de vitrificação proporcionou uma maior taxa de normalidade nos folículos vitrificados ( $P < 0.05$ ). Entretanto, ao incubar os folículos tratados com 10 µg/mL, observa-se uma redução significativa no percentual de folículos normais ( $P < 0.05$ ). No entanto, a avaliação ultraestrutural demonstra que, após incubação, os folículos tratados com 10 µg/mL do extrato apresentaram redução na vacuolização e uma melhor manutenção da normalidade de algumas organelas, como as mitocôndrias, o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi, quando comparado apenas com o vitrificado.

As alterações e sinais de degeneração folicular, observadas após incubação, podem ser atribuídos ao próprio processo de vitrificação, que torna os folículos menos tolerantes ao ambiente *in vitro* e mais propensos à morte celular (Donfack *et al.*, 2018). Além disso, o período de incubação de 24 h, parece não ser suficiente para promover maior desenvolvimento e manutenção da qualidade folicular (Faustino *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2011). Esses parâmetros observados, juntamente com o aumento da atividade da SOD na concentração de 10 µg/mL ( $P < 0.05$ ), evidenciam a tentativa das células em combater o dano que estava sendo ocasionado e sugere que talvez não tenha havido tempo suficiente para um reparo mais completo. Tendo em vista que, após o aquecimento do tecido criopreservado, o mesmo precisa de um tempo para se reorganizar e crescer novamente *in vitro* (Gastal *et al.*, 2017).

Durante o processo de aquecimento do tecido vitrificado, uma vez que ocorre a reintrodução de oxigênio nas células, há o desencadeamento de reações de oxirredução que levam a formação de radicais livres (Rocha *et al.*, 2018) ocasionando dano celular. Esse processo parece ter sido evitado, visto que os folículos vitrificados na concentração de 10 µg/ml, obtiveram uma maior manutenção da arquitetura folicular ( $P < 0.05$ ). Dessa forma, para que essa viabilidade possa ser mantida durante o período de incubação, uma alternativa interessante seria a adição de substâncias

que possam atenuar o processo de atresia e mitigar as EROs durante o período *in vitro*. Visto que mesmo um curto período de cultivo pode reduzir o número de folículos viáveis em decorrência do estresse oxidativo (Carvalho *et al.*, 2011). Já se foi relatado que a adição de substâncias antioxidantes, como a catalase em diferentes etapas do protocolo de vitrificação (solução de vitrificação e/ou aquecimento), promovem a redução de EROs (Carvalho *et al.*, 2014).

Durante o período de incubação dos fragmentos ovarianos a concentração de 100 µg/mL promoveu um maior percentual de ativação folicular ( $P < 0.05$ ). Esse processo de ativação folicular em mamíferos pode ser regulado por algumas vias como a fosfatidilinositol-3-quinase/proteína quinase B/forkhead box O3a (PI3K-AKT-FOXO3a) que também pode ser ativada através de mTORC1 (*mechanistic target of rapamycin complex 1*) (Zheng *et al.*, 2012). Em bovinos, a fosfatase homóloga à tensina (PTEN) é o gene que codifica o regulador negativo da PI3K, quando este foi inibido, resultou em hiperativação de folículos primordiais através da PI3K/AKT/FOXO3 (Maidarti *et al.*, 2018). A literatura demonstra que a utilização do suco de romã em uma linhagem de células de carcinoma humano (HT-29) promoveu inibição da fosforilação de PI3K/AKT e mTOR (Banerjee *et al.*, 2013). O mesmo foi observado por LI *et al.*, (2020), onde, ao utilizar o extrato metanólico das flores de romã em uma linhagem de pre-adipócitos (3T3-L1), foi visto que a utilização de concentrações mais baixas aumentaram a ativação da via PI3K/AKT e mTOR e doses maiores inibiram. Em nosso estudo o processo de ativação ocorreu possivelmente por uma das vias já citadas, o que demonstra que o extrato de *Punica granatum L.* possivelmente regulou de forma positiva essas vias em folículos ovarianos.

A comunicação intracelular entre os vários tipos de células presentes no ovário e o estroma é necessária para o desenvolvimento normal e manutenção da arquitetura do folículo, uma vez que a maturação do oócito depende disso (Woodruff *et al.*, 2007). Nesse contexto, sabe-se que os protocolos de vitrificação ocasionam a redução da densidade das células presentes no estroma (Gastal *et al.*, 2017). Foi observada, uma redução na densidade do estroma ovariano em todos os tratamentos vitrificados ou incubados ( $P < 0.05$ ). Essa redução pode ser parcialmente atribuída aos processos físicos ocorridos durante a criopreservação (Gastal *et al.*, 2017). Entretanto, a concentração de 10 µg/mL, proporcionou uma maior manutenção da densidade celular ( $P < 0.05$ ). Essa manutenção é crucial, pois essas células fornecem suporte e, junto a teca, auxiliam a biossíntese de estradiol, proliferação e inibição da apoptose



em células da granulosa (Qiu *et al.*, 2014).

Tendo em vista as alterações que possam ocorrer no estroma, um outro parâmetro importante para se avaliar são os componentes da matriz extra celular. A MEC é crucial para a manutenção das interações célula-célula, auxiliando no desenvolvimento e migração dos folículos dentro do ovário (Woodruff *et al.*, 2007). Em situações de dano tecidual a MEC é constantemente remodelada em um processo que deve ser altamente coordenado, falhas durante esse momento podem ocasionar maior neovascularização, o que pode gerar fibrose tecidual (Ruger *et al.*, 2020). A fibrose é uma característica do envelhecimento do estroma ovariano; no entanto, ela pode estar correlacionada a outros fatores, como o con/descongelamento do tecido vitrificado (Kitajima *et al.*, 2022). A concentração de 10 µg/mL aumentou de forma significativa a marcação para fibras de colágeno do tipo I, juntamente com a diminuição das fibras do tipo III no tecido vitrificado ( $P < 0.05$ ). Nesse contexto, sabe-se que o processo de fibrose é caracterizado pela formação excessiva de colágeno tipo I e diminuição do tipo III (Henriksen *et al.*, 2016). Entretanto, quando incubados, a concentração de 10 µg/mL obteve uma redução de ambas as fibras ( $P < 0.05$ ). O que demonstra a readaptação do tecido durante a retomada do metabolismo ao processo de dano que estava ocorrendo. Apresentando percentuais aceitáveis, quanto a proporção de fibras tipo I e tipo III que é de cerca de 70 e 30%, respectivamente. Sendo assim, pode-se observar que o EE-PG não proporcionou grandes alterações na MEC do tecido ovariano vitrificado, o que representa um efeito positivo. Isso é relevante, visto que a MEC auxilia na adesão celular e apoia diversas funções celulares durante a foliculogênese (Woodruff *et al.*, 2007).

Através dos métodos de captura do radical ABTS e DPPH, foi possível observar que o extrato de *Punica granatum L.* possui alta capacidade antioxidante, sendo similar ao ácido ascórbico, potente antioxidante já conhecido ( $P < 0.05$ ). Corroborando com tais achados, o estudo de Jacob *et al.* (2018), produziu diferentes extratos da casca de romã (Aquoso, MetOH e Aquoso de acetona) e constatou sua alta atividade antioxidante, sendo esta atividade atribuída aos compostos presentes como as punicalaginas e punicalinas. Dessa forma, utilizar os extratos oriundos da *Punica granatum L.* ou seus compostos isolados em diferentes pontos do processo de vitrificação pode ser uma alternativa promissora. Tendo em vista que as punicalaginas, consideradas os compostos majoritários da *Punica granatum L.* (Kulkarnia; Aradhya e Divakarb, 2004), já demonstraram efeitos antiapoptóticos *in vitro*, através da regulação

da expressão de Bcl-2-associated X protein (Bax) e B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) em uma linhagem de cardiomiócitos (H9c2) tratados com doxorrubicina (Ye *et al.*, 2019). Além disso, promoveu a redução de EROs em diferentes situações de estresse em linhagens de cardiomiócitos (H9c2; Ye *et al.*, 2019), neurônios fetais (Pc12; Clementi *et al.*, 2018) e queratinócitos (HaCaT; Liu *et al.*, 2019).

Nesse contexto, sabe-se que o processo de vitrificação provoca alterações físico-químicas que incluem um aumento na produção de EROs, levando ao estresse oxidativo (Kaushik *et al.*, 2022). Sendo este estresse caracterizado por um desequilíbrio entre os agentes pró-oxidantes (radicais livres) e antioxidantes. Esse processo pode ocasionar alterações na atividade do sistema de defesa antioxidante, composto pelas enzimas SOD, CAT e GSH-Px (Furtado *et al.*, 2021). As diferentes concentrações não influenciaram na atividade da CAT e GSH-Px, entretanto a concentração de 10 µg/mL aumentou a atividade da enzima SOD após incubação ( $P < 0.05$ ). Esta mesma concentração manteve os níveis de MDA em sua normalidade. A SOD atua na conversão do ânion superóxido em um produto menos danoso, que é o peróxido de oxigênio ( $H_2O_2$ ) (Furtado *et al.*, 2021). Sendo assim, a literatura já demonstra que o aumento da SOD pode reduzir a peroxidação lipídica (RAO *et al.*, 2021). Semelhante aos achados deste trabalho, foi visto que o pré-tratamento utilizando o extrato MeOH da casca de *Punica granatum L.* promoveu um aumento da atividade da SOD e redução dos níveis de MDA em um modelo de toxicidade hepática (Chidambara *et al.*, 2002). O mesmo comportamento foi observado em indivíduos praticantes de exercício físico intenso, onde, ao realizar a ingestão do suco de *Punica granatum L.*, os níveis séricos de SOD aumentaram, acompanhados da redução dos níveis de MDA quando comparados aos controles (Naghizadeh-Baghi *et al.*, 2015). Aliado à SOD, a redução dos níveis de MDA pode estar atrelada também à capacidade que os compostos oriundos da *Punica granatum L.* têm de interromper as reações geradas pelos radicais peróxila ( $ROO^{\cdot}$ ), impedindo a propagação da peroxidação lipídica (Kulkarnia; Aradhya e Divakarb, 2004).

Em condições fisiológicas, a oxidação do óxido nítrico (NO) leva a formação de nitrito ( $NO_2^-$ ) nas camadas das células da teca, desempenhando papel na ovulação e sobrevivência folicular (Sugino *et al.*, 1996; Yamagata *et al.*, 2002). Dessa forma, outros marcadores bioquímicos, como a produção de ( $NO_2^-$ ), têm sido associados como um indicador de viabilidade das células da granulosa em folículos pré-antrais caprinos (Bruno *et al.*, 2008), além de atuar como regulador dose-dependente da

síntese de esteroides em células da granulosa bovinas (Chun *et al.*, 1996). A reação de Griess é a abordagem analítica mais frequentemente utilizada para quantificar os principais metabólitos estáveis de NO, ou seja, nitrato e nitrito (Tsikas; 2007). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos quando a produção de nitrito ( $p > 0.05$ ). Assim como não diferiram de forma significativa na quantidade de glutatona, através da quantificação dos níveis de Tiol ( $P > 0.05$ ). A enzima GSH-Px tem a capacidade de oxidar a glutatona reduzida (GSH) formando glutatona oxidada (GSSG) e água. Quando não se tem a oxidação do GSH em GSSG, é possível quantificar o grupo -SH (TIOL) (Furtado *et al.*, 2021). Nesse contexto, sabe-se que o Tiol é um agente envolvido em inúmeras funções biológicas, como a redução dos efeitos citotóxicos ocasionados pela produção excessiva de EROs (Crocomo *et al.*, 2012).

## **5 CONCLUSÕES**

Em conclusão, a adição de 10µg/mL do extrato etanólico de *Punica granatum L.* promoveu a manutenção da morfológica dos folículos vitrificados. Após a incubação, observou-se a preservação da densidade do estroma, um aumento da atividade da SOD, a manutenção dos níveis de MDA e a redução das alterações ultraestruturais. No entanto, são necessários mais estudos para elucidar os mecanismos de sinalização pelos quais os extratos oriundos da casca de *Punica granatum L.* atuam sobre os folículos ovarianos.

### **Contribuições dos autores**

SDM e VRA conceberam o estudo e escreveram o manuscrito

SDM, MAFO, FCC e VANA contribuíram com os experimentos

SNB realizou as análises ultraestruturais

JRVS e VMC forneceram infraestrutura laboratorial para realização dos experimentos

### **Financiamento**

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) sob o processo nº 407992/2021-9.

### **Declaração de conflito de interesses**

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

## Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à Central Analítica-UFC (financiada por Finep-CT-INFRA, CAPES-Pró-Equipamentos e MCTI-CNPq-Sis-Nano2.0) pelas análises microscópicas. SDM foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). VRA foi bolsista de pós-doutorado sênior (PDS) do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processo n 102449/2022-8).

## 6 REFERÊNCIAS

- AEBI, H.; Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, 105:121–126. 1984.
- AKEL, R.A.; GUO, X.M.; MORAVEK, M.B.; CONFINO, R.; SMITH, K. N.; LAWSON, A. K.; KLOCK, S.C.; TANNER III, E.J.; PAVONE, M.E. Ovarian Stimulation Is Safe and Effective for Patients with Gynecologic Cancer. **Journal of adolescent and young adult oncology**, 9(3), 367–374. 2020.
- ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. **Journal of andrology**, 13(3), 232–241. 1992.
- ALVES, K.A.; ALVES, B.G.; GASTAL, G.D.; DE TARSO, S.G.; GASTAL, M.O.; FIGUEIREDO, J.R.; GAMBARINI, M.L.; GASTAL, E.L. The Mare Model to Study the Effects of Ovarian Dynamics on Preantral Follicle Features. **PloS one**, 11(2), e0149693. 2016.
- BANERJEE, N.; KIM, H.; TALCOTT, S.; MERTENS-TALCOTT, S. Pomegranate polyphenolics suppressed azoxymethane-induced colorectal aberrant crypt foci and inflammation: possible role of miR-126/VCAM-1 and miR-126/PI3K/AKT/mTOR. **Carcinogenesis**, 34(12), 2814–2822. 2013
- BANNISTER, J.V; CALABRESE, L. Assays for superoxide dismutase. *Methods of biochemical analysis*, 32:137–144. 1987.

BRITO, D.C.C.; DOMINGUES, S.F.S.; RODRIGUES, A.P.R.; MASIDE, C.; LUNARDI, F.O.; WU, X.; FIGUEIREDO, J.R.; PIECZARKA, J.C.; SANTOS, R. R.

Cryopreservation of domestic cat (*Felis catus*) ovarian tissue: Comparison of two vitrification methods. **Theriogenology**, 111, 69–77. 2018.

BRUNO, J.B.; LIMA-VERDE, I.B.; MARTINS, F.S.; MATOS, M.H.T.; LOPES, C.A.P.; MAIA, J.E.; BÁO, S.N.; NOBRE, J.H.V.; MAIA, F.D.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVA, J.R.V.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Característica histológica, ultra-estrutural e produção de nitrito de folículos pré-antrais caprinos cultivados in vitro na ausência ou presença de soro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 60, 1329–37. 2008.

CARVALHO, A.A.; FAUSTINO, L.R.; SILVA, C.M.; CASTRO, S.V.; LUZ, H.K.; ROSSETTO, R.; LOPES, C.A.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.; COSTA, A.P. Influence of vitrification techniques and solutions on the morphology and survival of preantral follicles after in vitro culture of caprine ovarian tissue. **Theriogenology**, 76(5), 933–941. 2011.

CHAVES, R.N.; MARTINS, F.S.; SARAIVA, M.V.; CELESTINO, J.J.; LOPES, C. A.; CORREIA, J.C.; VERDE, I.B.; MATOS, M.H.; BÁO, S.N.; NAME, K.P.; CAMPELLO, C.C.; SILVA, J.R.; FIGUEIREDO, J.R. Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured in vitro. **Reproduction, fertility, and development**, 20(5), 640–647. 2008.

CHIDAMBARA, M.K.N.; JAYAPRAKASHA, G.K.; SINGH, R.P. Studies on Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel Extract Using in Vivo Models. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50(17), 4791–4795. 2002.

CHUN, S.Y.; EISENHAUER, K.M.; MINAMI, S.; BILLIG, H.; PERLAS, E.; HSUEH, A.J. Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. **Endocrinology**, 137(4), 1447–1456. 1996.

CIGHETTI, G.; DEBIASI, S.; PARONI, R.; ALLEVI, P. Free and total malondialdehyde

assessment in biological matrices by gas chromatography-mass spectrometry: what is needed for an accurate detection. **Analytical Biochemistry**, v. 266, p. 222-229, 1999.

CLEMENTI, M.E.; PANI, G.; SAMPAOLESE, B.; TRINGALI, G. Punicalagin reduces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity and apoptosis in PC12 cells by modulating the levels of reactive oxygen species. **Nutritional neuroscience**, 21(6), 447–454. 2018.

COSTA, F.D.C.; VASCONCELOS, E.M.; AZEVEDO, V. A.N.; MELO, L.R.P.F.; SOARES, M.D.; SILVA, J.R.V.; SILVA, A.W.B, SOUZA, A.L.P. Aloe vera increases mRNA expression of antioxidant enzymes in cryopreserved bovine ovarian tissue and promotes follicular growth and survival after in vitro culture. **Cryobiology**, 102, 104–113. 2021.

CROCOMO, L.F.; FILLHO, W.C.M.; LANDIN-ALVARENGA, F.C.; BICUDO, S.D. Produção de embriões in vitro: Estresse oxidativo e antioxidantes. **Veterinária e Zootecnia**, 19, 470–9. 2012.

DEL-POZO-LÉRIDA, S.; SALVADOR, C.; MARTÍNEZ-SOLER, F.; TORTOSA, A.; PERUCHO, M.; GIMÉNEZ-BONAFÉ, P. Preservation of fertility in patients with cancer (Review). **Oncology reports**, 41(5), 2607–2614. 2019.

DO NASCIMENTO, J. E. T., RODRIGUES, A. L. M., DE LISBOA, D. S., LIBERATO, H.R.; FALCÃO, M.J.C.; DA SILVA, C.R.; NOBRE JÚNIOR, H.V.; BRAZ FILHO, R.; DE PAULA JUNIOR, V.F.; ALVES, D.R.; DE MORAIS, S.M. Chemical Composition and Antifungal *In Vitro* and *In Silico*, Antioxidant, and Anticholinesterase Activities of Extracts and Constituents of *Ouratea fieldingiana* (DC.) Baill. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, 2018, 1748487. 2018.

DONFACK, N.J.; ALVES, K.A.; ALVES, B.G.; ROCHA, R.M.P.; BRUNO, J.B.; LIMA, L.F.; RODRIGUES, A.P.R. In vivo and in vitro strategies to support caprine preantral follicle development after ovarian tissue vitrification. **Reproduction, Fertility and Development**, 30(8), 1055. 2018.

EL CURY-SILVA, T.; NUNES, M.E.G.; CASALECHI, M.; COMIM, F.V.;

RODRIGUES, J.K.; REIS, F.M. Cryoprotectant agents for ovarian tissue vitrification: Systematic review. **Cryobiology**, 103, 7–14. 2021.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 82, 70–77. 1959.

FAUSTINO, L.R.; SANTOS, R.R.; SILVA, C.M.; PINTO, L.C.; CELESTINO, J.J.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Goat and sheep ovarian tissue cryopreservation: Effects on the morphology and development of primordial follicles and density of stromal cell. **Animal reproduction science**, 122(1-2), 90–97. 2010.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, 105:114–120. 1984.

FURTADO, R.L.; MARTINS, J.E.R.; OLIVEIRA, M.A.F.; GUERREIRO, D.D.; DE SÁ, N.A.R.; FERRAZ, A.S.M.; CECCATTO, V.M.; RODRIGUES, A.P.R.; ARAÚJO, V.R. Acute effect of high-intensity interval training exercise on redox status in the ovaries of rats fed a high-fat diet. **Reproduction, fertility, and development**, 33(12), 713–724. 2021.

GAMZATOVA, Z.; KOMLICHENKO, E.; KOSTAREVA, A.; GALAGUDZA, M.; ULRIKH, E.; ZUBAREVA, T.; KALININA, E. Autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue – effective method of fertility preservation in cancer patients. **Gynecological Endocrinology**, 30(sup1), 43–47. 2014.

GASTAL, G.D.A.; AGUIAR, F.L.N.; ALVES, B.G.; ALVES, K.A.; DE TARSO, S.G.S.; ISHAK, G.M.; CAVINDER, C.A.; FEUGANG, J.M.; GASTAL, E.L. Equine ovarian tissue viability after cryopreservation and in vitro culture. **Theriogenology**, 97, 139–147. 2017.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R., Analysis of nitrate, nitrite, and nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131-138, 1982.

GUÉRIN, P.; EL MOUATASSIM, S.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings, **Human Reproduction Update**, v. 7, p. 175–189. 2001.

HENRIKSEN, K.; KARSDAL, M.A. Type I collagen. **Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin**, p. 1–11. 2016.

HULSHOF, S.C.J.; FIGUEIREDO, J.R.; BECKERS, J.F.; BEVERS M.M.; VAN DEN HURK, R. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Veterinary Quarterly**, v.16:2,p .78-80, 1994.

JACOB, J.; LAKSHMANAPERMALESAMY, P.; ILLURI, R.; BHOSLE, D.; SANGLI, G. K.; MUNDKINAJEDDU, D. *In vitro* Evaluation of Antioxidant Potential of Isolated Compounds and Various Extracts of Peel of *Punica granatum* L. **Pharmacognosy research**, 10(1), 44–48. 2018.

JIVAGO, J.L.P.R.; PAULINI, F.; SILVA, R.C.; ARAUJO, M.S.; MARINHO, A.P.S.; LUCCI, C.M. Cryopreservation and characterization of canine preantral follicles. **Cryobiology**, 81, 34–42. 2018.

JUNQUEIRA, L.C.; COSSERMELLI, W.; BRENTANI, R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. **Archivum histologicum Japonicum = Nihon soshikigaku kiroku**, 41(3), 267–274. 1978.

KAUSHIK, K.; GUPTA, P.; JOHNSON, P.; KRISHNA, K.; NANDI, S.; MONDAL, S.; KUMAR TEJ, J. N.; BENCE, S.; CSEH, S. Effect of retinol in the vitrification medium on viability of vitrified ovine preantral follicles and expression of key developmental and apoptosis related genes. **Cryoletters**, 43(1), 10–17. 2022.

KITAJIMA, M.; MURAKAMI, N.; KITAJIMA, Y.; KAJIMURA, I.; MATSUMURA, A.; MATSUMOTO, K.; HARADA, A.; MIURA, K. Accumulation of fibrosis and altered perifollicular stromal differentiation in vitrified-thawed human ovarian tissue xenografted to nude mice. **Reproductive medicine and biology**, 21(1), e12451. 2022.



KULKARNIA, A. P.; ARADHYAA, S. M.; DIVAKARB, S. Isolation and identification of a radical scavenging antioxidant – Punicalagin from pith and carpellary membrane of pomegranate fruit. *Food Chemistry*, v.87, p.551–557, 2004.

LEE, S.; RYU, K.J.; KIM, B.; KANG, D.; KIM, Y.Y.; KIM, T. Comparison between Slow Freezing and Vitrification for Human Ovarian Tissue Cryopreservation and Xenotransplantation. *International journal of molecular sciences*, 20(13), 3346. 2019.

LEONEL, E.C.R.; CORRAL, A.; RISCO, R.; CAMBONI, A.; TABOGA, S.R.; KILBRIDE, P.; AMORIM, C. A. Stepped vitrification technique for human ovarian tissue cryopreservation. *Scientific Reports*, 9(1). 2019

LI, T.; ZHANG, L.; JIN, C.; XIONG, Y.; CHENG, Y. Y.; CHEN, K. Pomegranate flower extract bidirectionally regulates the proliferation, differentiation and apoptosis of 3T3-L1 cells through regulation of PPAR $\gamma$  expression mediated by PI3K-AKT signaling pathway. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 131, 110769. 2020.

LIU, C.; GUO, H.; DA SILVA, N.A.; LI, D.; ZHANG, K.; WAN, Y.; GAO, X.H.; CHEN, H.D.; SEERAM, N.P.; MA, H. Pomegranate (*Punica granatum*) Phenolics Ameliorate Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress and Cytotoxicity in Human Keratinocytes. *Journal of functional foods*, 54, 559–567. 2019.

MAHMOUDI A.M.; RAHBARGHAZI, R.; BEHESHTI, R.; ALIHEMMATI, A.; ALIPARASTI, M.R.; ABEDELAHI, A. Effects of Different Vitrification Solutions and Protocol on Follicular Ultrastructure and Revascularization of Autografted Mouse Ovarian Tissue. *Cell journal*, 22(4), 491–501. 2021.

MAIDARTI, M.; CLARKSON, Y.L.; MCLAUGHLIN, M.; ANDERSON, R.A.; TELFER, E.E. Inhibition of PTEN activates bovine non-growing follicles in vitro but increases DNA damage and reduces DNA repair response. *Human reproduction (Oxford, England)*, 34(2), 297–307. 2019.

NAGHIZADEH-BAGHI, A.; MAZANI, M.; SHADMAN-FARD, A.; NEMATI, A. Punica granatum juice effects on oxidative stress in severe physical activity. **Materia socio-medica**, 27(1), 48–51. 2015.

ÑAUPAS, L.V.S.; BRITO, D.C.C.; DE SOUZA, S.S.; BRANDÃO, F.A.S.; DA SILVA, R.F.; DA SILVA, R.R.; DE OLIVEIRA, A.C.M.M.; ARAÚJO, A.A.; ALVES, B.G.; GUEDES, M.I. F.; SILVA, J.Y.G.; CORDOVA, A.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Alpha Lipoic Acid Supplementation Improves Ovarian Tissue Vitrification Outcome: An Alternative to Preserve the Ovarian Function of Morada Nova Ewe. **Reproductive science**, 28(11), 3109– 3122. 2021

QIU, M.; LIU, J.; HAN, C.; WU, B.; YANG, Z.; SU, F.; QUAN, F.; ZHANG, Y. The influence of ovarian stromal/theca cells during in vitro culture on steroidogenesis, proliferation and apoptosis of granulosa cells derived from the goat ovary. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, 49(1), 170–176. 2014

RAO, Y. L.; GANARAJA, B.; MARATHE, A.; MANJREKAR, P. A.; JOY, T.; ULLAL, S.; PAI, M. M.; MURLIMANJU, B. V. Comparison of malondialdehyde levels and superoxide dismutase activity in resveratrol and resveratrol/donepezil combination treatment groups in Alzheimer's disease induced rat model. **3 Biotech**, 11(7), 329. 2021.

EL-SHESHTAWY, R.I.; EL-SISY, G.A.; EL-NATTAT, W.S.; Effects of pomegranate juice in Tris-based extender on cattle semen quality after chilling and cryopreservation, **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 5(4), p. 335-339 2016.

ROCHA, C.D.; SOARES, M.M.; ANTONINO, D.C.; JÚNIOR, J.M.; MOHALLEM, R.F.F.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R.; BELETTI, M.E.; JACOMINI, J.O.; ALVES, B.G.; ALVES, K.A. Positive effect of resveratrol against preantral follicles degeneration after ovarian tissue vitrification. **Theriogenology**, 114, 244–251. 2018.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.D.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. Metodologia Científica: Determinação

Da Atividade Antioxidante Total Em Frutas Pela Captura Do Radical Livre DPPH  
Introdução. Comun. Tec. Embrapa 2007a, 127, 1–4.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.D.G.;  
PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. Metodologia Científica: Determinação  
Da Atividade Antioxidante Total Em Frutas Pela Captura Do Radical Livre ABTS+  
Introdução. Comun. Tec. Embrapa 2007b, 127, 1–4.

RÜGER, B.M.; BUCHACHER, T.; DAUBER, E.M.; PASZTOREK, M.; UHRIN, P.;  
FISCHER, M.B.; BREUSS, J.M.; LEITNER, G.C. *De novo* Vessel Formation Through  
Cross-Talk of Blood-Derived Cells and Mesenchymal Stromal Cells in the Absence of  
Pre-existing Vascular Structures. **Frontiers in bioengineering and  
biotechnology**, 8, 602210. 2020

SEERAM, N.P.; ADAMS, L.S.; HENNING, S.M.; NIU, Y.; ZHANG, Y.; NAIR, M. G.;  
HEBER, D. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of  
punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in  
combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. **The Journal of  
nutritional biochemistry**, 16(6), 360–367. 2005.

SHAHSAVARI, M.H.; ALVES, K.A.; ALVES, B.G.; LIMA, L.F.; VIZCARRA, D. A.M.;  
BERROCAL, D.J.D.; SILVA, L.M.; SILVA, Y.P.; ZELINSKI, M.B.; FIGUEIREDO, J.R.;  
MOGHADDAM, G.; RODRIGUES, A.P.R. Impacts of different synthetic polymers on  
vitrification of ovarian tissue. **Cryobiology**, 94, 66–72. 2020.

SIEGEL, R.L.; MILLER, K.D.; WAGLE, N.S.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2023. **CA:  
a cancer journal for clinicians**, 73(1), 17–48. 2023.

SILVA, L.M.; MBEMYA, G.T.; GUERREIRO, D.D.; BRITO, D.C.C.; DONFACK, N.J.;  
MORAIS, M.L.G.S.; RODRIGUES, G.Q.; BRUNO, J.B.; ROCHA, R.M.P.; ALVES,  
B.G.; APGAR, G.A.; CIBIN, F.W.S.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Effect  
of Catalase or Alpha Lipoic Acid Supplementation in the Vitrification Solution of Ovine  
Ovarian Tissue. **Biopreservation and biobanking**, 16(4), 258–269. 2018.

SINDHI, V.; GUPTA, V.; SHARMA, K.; BHATNAGAR, S.; KUMARI, R.; DHAKA N. Potential applications of antioxidants - A review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7 p. 828–35. 2013;

SUGINO, N.; TAKIGUCHI, S.; ONO, M.; TAMURA, H.; SHIMAMURA, K.; NAKAMURA, Y.; TSURUTA, R.; SADAMITSU, D.; UEDA, T.; MAEKAWA, T.; KATO, H. Nitric oxide concentrations in the follicular fluid and apoptosis of granulosa cells in human follicles. **Human reproduction**, 11(11), 2484–2487. 1996.

TAKAHASHI, M.; TAKANO, M.; ASADA, K. Tris-induced cross-linking of thylakoid peptides; thiol oxidation catalyzed by tris-Cu<sup>2+</sup> complexes as a possible mechanism. **Journal of biochemistry**, 90(1), 87–94. 1981.

TIONG, V.; ROZITA, A. M.; TAIB, N.A.; YIP, C.H.; NG, C.H. Incidence of Chemotherapy-Induced Ovarian Failure in Premenopausal Women Undergoing Chemotherapy for Breast Cancer. **World Journal of Surgery**, 38(9), 2288–2296. 2014.

TSIKAS, D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, 851(1-2), 51–70. 2007.

WOODRUFF, T.K.; SHEA, L.D. The role of the extracellular matrix in ovarian follicle development. **Reproductive sciences**, 14(8), 6–10. 2007.

XING, W.; ZHOU, C.; BIAN, J.; MONTAG, M.; XU, Y.; LI, Y.; LI, T. Solid-surface vitrification is an appropriate and convenient method for cryopreservation of isolated rat follicles. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 8, 42. 2010.

YAMAGATA, Y.; NAKAMURA, Y.; SUGINO, N.; HARADA, A.; TAKAYAMA, H.; KASHIDA, S.; KATO, H. Alterations in nitrate/nitrite and nitric oxide synthase in preovulatory follicles in gonadotropin-primed immature rat. **Endocrine journal**, 49(2), 219–226. 2002.

YE, M.; ZHANG, L.; YAN, Y.; LIN, H. Punicalagin protects H9c2 cardiomyocytes from doxorubicin-induced toxicity through activation of Nrf2/HO-1 signaling. **Bioscience reports**, 39(5), 2019.

ZHANG, J. M., LI, L. X., LIU, X. L., YANG, Y. X., & WAN, X. P. Sucrose affecting successful transplantation of vitrified-thawed mouse ovarian tissues. **Journal of assisted reproduction and genetics**, 26(2-3), 137–142. 2009.

ZHENG, W.; NAGARAJU, G.; LIU, Z.; LIU, K. Functional roles of the phosphatidylinositol 3-kinases (PI3Ks) signaling in the mammalian ovary. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 356(1-2), 24–30. 2012.

## 7 CONCLUSÃO

De acordo com os achados, concluímos que:

- ✓ A adição de 10 µg/mL do extrato da casca de romã a solução de vitrificação promoveu a manutenção da morfologia folicular, com a redução das alterações ultraestruturais.

## 8 PERSPECTIVAS FUTURAS

O Presente trabalho deixa como perspectivas futuras:

- ✓ Avaliar a utilização do extrato etanólico da casca de *punica granatum L.* em diferentes etapas da criopreservação
- ✓ Verificar os efeitos benéficos da *Punica granatum L.* na vitrificação de outros tipos de células como gametas e embriões
- ✓ Verificar a ação antioxidante de extratos oriundos da romã utilizando diferentes métodos de extração

## ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA

 <p>UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ</p>	<p><b>Comissão de Ética para o Uso de Animais</b>  <b>Av. Dr. Silas Munguba, 1700 – Itaperi</b>  <b>CEP 60740-903 – fone 3101-9890</b>  <b>ceua.uece@uece.br – www.uece.br/ceua</b></p>	 <p>GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ Secretaria da Ciência, Tecnologia e Educação Superior</p>			
<b>CERTIFICADO</b>					
<p>Certificamos que o Projeto intitulado “<b>Mecanismos de ação da <i>Punica granatum</i> L. durante a vitrificação de tecido ovariano bovino</b>”, registrado sob o número <b>NUP 31032.002523/2023-41</b>, tendo como pesquisador principal <b>Valdevane Rocha Araújo</b>, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pela <b>Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará</b> (CEUA – UECE). Este certificado expira-se em 31 de Dezembro de 2025.</p>					
<b>CERTIFICATE</b>					
<p>We hereby certify that the Project entitled “<b>Mechanisms of action of <i>Punica granatum</i> L. during vitrification of bovine ovarian tissue</b>” registered with the protocol <b>NUP 31032.002523/2023-41</b>, under the supervision of <b>Valdevane Rocha Araújo</b>, is in agreement with Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the <b>Ethics Committee in Animal Experimentation of Ceará State University</b> (CEUA – UECE). This certificate will expire on December 31<sup>st</sup>, 2025.</p>					
<b>RESUMO</b>					
<b>Vigência do projeto</b>	Início	18/01/2024	Fim	31/12/2025	
<b>Espécie/Linhagem</b>	<i>Bos taurus</i> (Bovino SRD)				
<b>Número de animais</b>	15	Peso	variado	Idade	variado
<b>Sexo</b>	X	Feminino		Masculino	
<b>Origem</b>	Abatedouro de Fazenda Local				
<b>Metodologia</b>	X	Adequada		Não adequada	
<b>Cronograma</b>	X	Adequado		Ausente/ Não adequado	
<b>Ofício de encaminhamento</b>	X	Presente		Ausente/ Não adequado	
<b>Orçamento</b>	X	Adequado		Ausente/ Não adequado	
<b>Financiamento</b>	Órgão de fomento	Parcerias e recursos de pesquisa			
	Edital ou N. processo	-			

Fortaleza, 18 de janeiro de 2024.

Documento assinado digitalmente



**VANIA MARILANDE CECCATTO**  
 Data: 18/01/2024 14:19:19-0300  
 Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

*Vania Marilande Ceccatto*  
 Presidente CEUA-UECE

## REFERÊNCIAS

- ABEDPOUR, N.; SALEHNIA, M.; GHORBANMEHR, N. The effects of lysophosphatidic acid on the incidence of cell death in cultured vitrified and non-vitrified mouse ovarian tissue: Separation of necrosis and apoptosis border. **Cell Journal**, 20(3), 403. 2018.
- AFZALI, A.; NAZARI, H.; AHMADI, E.; DAVOODIAN, N.; AMIDI, F.; TAHERI, F.; BASHIRI, Z.; KADIVAR, A.; NEMATI DEHKORDI, M. The protective effects of astaxanthin on pre-antral follicle degeneration in ovine vitrified/warmed ovarian tissue. **Cryobiology**, 2023.
- ALALAWI, S.; ALBALAWI, F.; RAMJI, D.P. The Role of Punicalagin and Its Metabolites in Atherosclerosis and Risk Factors Associated with the Disease. **International journal of molecular sciences**, 24(10), 8476. 2023.
- AL-KHAWALDE, A.A.A.; ABUKHALIL, M.H.; JGHEF, M.M.; ALFWUAIRES, M.A.; ALARYANI, F.S.; ALADAILEH, S.H.; ALGEFARE, A.I.; KARIMULLA, S.; ALASMARI, F.; ALDAL'IN, H.K.; ALANEZI, A.A.; ALTHUNIBAT, O.Y. Punicalagin Protects against the Development of Methotrexate-Induced Hepatotoxicity in Mice via Activating Nrf2 Signaling and Decreasing Oxidative Stress, Inflammation, and Cell Death. **International journal of molecular sciences**, 23(20). 2022.
- AMMAR, A.; TURKI, M.; HAMMOUDA, O.; CHTOUROU, H.; TRABELSI, K.; BOUAZIZ, M.; ABDELKARIM, O.; HOEKELMANN, A.; AYADI, F.; SOUISSI, N.; BAILEY, S.J.; DRISS, T.; YAICH, S. Effects of Pomegranate Juice Supplementation on Oxidative Stress Biomarkers Following Weightlifting Exercise. **Nutrients**, 9, 819. 2017.
- ARAÚJO, V.R.; CELESTINO, J.J.D.H.; CHAVES, R.N. Qualitative and quantitative aspects of atresia during mammalian folliculogenesis. **Ciência Animal**, 112-128. 2021.
- ARAÚJO, V.R.; GASTAL, M.O.; FIGUEIREDO, J.R.; GASTAL, E.L. *In vitro* culture of bovine preantral follicles: a review. **Reproductive biology and endocrinolog**, 12,



78. 2014.

BAERWALD, A.R.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. **Human Reproduction Update**, 18(1), 73–91. 2012.

BAHR, J.M. Ovary, overview. **Reference Module in Biomedical Sciences**, v. 2, p. 3-7, 2018.

BDELHAFEZ, F.F.; DESAI, N.; ABOU-SETTA, A.M.; FALCONE, T.; GOLDFARB, J. Slow freezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: a systematic review and meta-analysis. **Reproductive biomedicine online**, 20(2), 209–222. 2010.

BERNE, R. M., LEVY, M. N., KOEPPEN, B. M. & STANTON, B. A. (2004). *Fisiologia* (\*), 5ª ed., **Ed. Elsevier**, 2020. Rio de Janeiro, RJ.

BEST, B.P. Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions. **Rejuvenation research**, 18(5), 422-436. 2015.

BHATIA, M. Apoptosis versus necrosis in acute pancreatitis. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v.284, p.608-627, 2004.

BORGES, E.N.; SILVA, R.C.; FUTINO, D.O.; ROCHA-JUNIOR, C.M.; AMORIM, C.A.; BÁO, S.N.; LUCCI, C.M. Cryopreservation of swine ovarian tissue: effect of different cryoprotectants on the structural preservation of preantral follicle oocytes. **Cryobiology**, 59(2), 195–200. 2009.

BRITO, D.C.; BRITO, A.B.; SCALERCIO, S.R.R.A.; PERCÁRIO, S.; MIRANDA, M.S.; ROCHA, R.M.; SANTOS, R.R. Vitamin E-analog Trolox prevents endoplasmic reticulum stress in frozen-thawed ovarian tissue of capuchin monkey (*Sapajus apella*). **Cell and Tissue Research**, 355(2), 471–480. 2013.

CAMPOS PETEAN, C.; FERRIANI, R.A.; DOS REIS, R.M.; DE MOURA, M.D.; JORDÃO, A. A.J.R.; NAVARRO, P.A. Lipid peroxidation and vitamin E in serum and

follicular fluid of infertile women with peritoneal endometriosis submitted to controlled ovarian hyperstimulation: a pilot study. **Fertility and sterility**, 90(6), 2080–2085, 2008.

CELESTINO, J.J.H.; CHAVES, R.N.; MATOS, M.H.T.; SILVA, M.S.J.; BRUNO, J.B.; MAIA-JÚNIOR, J.E.; FIGUEIREDO, J.R. Mechanisms of atresia in ovarian follicles. **Animal Reproduction**, 6(4), 495-508. 2018.

CHAUBE, S K.; SHRIVASTAV, T.G.; TIWARI, M.; PRASAD, S.; TRIPATHI, A.; PANDEY, A.K. Neem (*Azadirachta indica L.*) leaf extract deteriorates oocyte quality by inducing ROS-mediated apoptosis in mammals. **SpringerPlus**, 3(1), 464. 2014.

CHUNG, J.P.W.; CHAN, D.Y.L.; SONG, Y.; NG, E.Y.L.; LAW, T.S.M.; NG, K.; LEUNG, M. B.W.; WANG, S.; WAN, H.M.; LI, J.J.X.; WANG, C.C. Implementation of ovarian tissue cryopreservation in Hong Kong. **Hong Kong medical journal**, v. 29, n. 2, p. 121-131, 2023.

CRAIG, J.; ORISAKA, M.; WANG, H.; ORISAKA, S.; THOMPSON, W.; ZHU, C.; KOTSUJI, F.; TSANG, B.K. Gonadotropin and intra-ovarian signals regulating follicle development and atresia: the delicate balance between life and death. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, 12, 3628–3639. 2007.

DENG, Y.; LI, Y.; YANG, F.; ZENG, A.; YANG, S.; LUO, Y.; ZHANG, Y.; XIE, Y.; YE, T.; XIA, Y.; YIN, W. The extract from *Punica granatum* (pomegranate) peel induces apoptosis and impairs metastasis in prostate cancer cells. **Biomedicine & pharmacotherapy**, 93, 976–984. 2017.

DIKMEN, M.; OZTURK, N.; OZTURK, Y. The antioxidant potency of *Punica granatum L.* Fruit peel reduces cell proliferation and induces apoptosis on breast cancer. **Journal of medicinal food**, 14(12), 1638–1646. 2011.

DOS SANTOS MORAIS, M.L.G.; DE BRITO, D.C.C.; PINTO, Y.; SILVA, L.M.; VIZCARRA, D.M, SILVA, R.F.; CIBIN, F.W.S; CAMPELO, C.C.; ALVES, B.G.; ROCHA ARAÚJO, V.R; PINTO, F.C.; PESSOA, O.D.L.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES,

A.P.R. Natural antioxidants in the vitrification solution improve the ovine ovarian tissue preservation. **Reproductive biology**, 19(3), 270–278. 2019

EL-ASHMAWY, N.E.; KHEDR, E.G.; EL-BAHRAWY, H.A.; ABD EL-FATTAH, E.E. Effect of Pomegranate Hull Extract on Liver Neoplastic Changes in Rats: More than an Antioxidant. **Nutrition and cancer**, 68(6), 1044–1051. 2016.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v.35, p.495-516, 2007.

EL-SHALOFY, A.S.; ISMAIL, S.T.; BADAWEY, A.A.B.; DARWISH, G.M.; BADR, M.R.; MOAWAD, A.R. Effect of Disaccharide Inclusion in Vitrification and Warming Solutions on Developmental Competence of Vitrified/Warmed Germinal Vesicle Stage Buffalo Oocytes. **Cryo letters**, 41(6), 351–357. 2020.

ELYAMANY, M.; ABDELKADER, N.F.; GAD, A.M.; ASSAF, N.; FAWZY, H.M.; ELESAWY, W.H. Ellagic acid attenuates liver toxicity induced by valproic acid in rats. **Journal of Pharmacological Sciences**, 2020.

FAN, Y.; FLANAGAN, C.L.; BRUNETTE, M.A.; JONES, A.S.; BAKER, B.M.; SILBER, S. J.; SHIKANOV, A. Fresh and cryopreserved ovarian tissue from deceased young donors yields viable follicles. **F&S science**, 2(3), 248–258. 2021.

FURTADO, R.L.; MARTINS, J.E.R.; OLIVEIRA, M.A.F.; GUERREIRO, D.D.; DE SÁ, N.A.R.; FERRAZ, A.S.M.; CECCATTO, V.M.; RODRIGUES, A.P.R.; ARAÚJO, V.R. Acute effect of high-intensity interval training exercise on redox status in the ovaries of rats fed a high-fat diet. **Reproduction, fertility, and development**, 33(12), 713–724, 2021.

GANDOLFI, F.; GHIRINGHELLI, M.; BREVINI, TAL.; GANDOLFI, F.; GHIRINGHELLI, M.; BREVINI TAL. Bioengineering the ovary to preserve and reestablish female fertility. **Animal Reproduction**, vol.16, p. 45–51, 2019.

GASTAL, G.D.; ALVES, B.G.; ALVES, K.A.; SOUZA, M.E.; VIEIRA, A.D.; VARELA,

A.S.; FIGUEIREDO, J.R.; FEUGANG, J.M.; LUCIA, T.; GASTAL, E.L. Ovarian fragment sizes affect viability and morphology of preantral follicles during storage at 4°C. **Reproduction (Cambridge, England)**, 153(5), 577–587, 2017.

GIL, M.I.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; HESS-PIERCE, B.; HOLCROFT, D.M.; KADER, A. A. Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Its Relationship with Phenolic Composition and Processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48(10), 4581–4589, 2000.

GUPTA, P.; JOHNSON, P.; KAUSHIK, K.; KRISHNA, K.; NANDI, S.; MONDAL, S.; TEJ, J.N.K.; SOMOSKOI, B.; CSEH, S. Effect of retinol as antioxidant on the post-thaw viability and the expression of apoptosis and developmental competence-related genes of vitrified preantral follicles in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, 56(11), 1446–1455, 2021.

HEWLETT, M.; MAHALINGAIAH, S.; Update on primary ovarian insufficiency HSUEH, A.J.; KAWAMURA, K.; CHENG, Y.; FAUSER, B.C. Intraovarian control of early folliculogenesis. **Endocrine reviews**, 36(1), 1–24, 2015.

HYBERTSON, B.M.; GAO, B.; BOSE, S.K.; MCCORD, J.M. Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. **Molecular ASPECTS OF MEDICINE**, 32(4-6), 234–246, 2011.

IBRAHIM, M. A. A.; SADEK, M. T.; SHARAF ELDIN, H.E.M. Role of pomegranate extract in restoring endometrial androgen receptor expression, proliferation, and pinopodes in a rat model of polycystic ovary syndrome. **Morphologie: bulletin de l'Association des anatomistes**, 106(354), 145–154, 2022.

ISHIZAKI, T.; TAKEUCHI, Y.; ISHIBASHI, K.; GOTOH, N.; HIRATA, E.; KURODA, K. Cryopreservation of tissues by slow-freezing using an emerging zwitterionic cryoprotectant. **Scientific reports**, 13(1), 37, 2023.

JAVED, M.; TUNIO, M.T.; ABDUL RAUF, H.; BHUTTA, M.F.; NAZ, S.; IQBAL, S. Addition of pomegranate juice (*Punica granatum*) in tris-based extender improves

post-thaw quality, motion dynamics and in vivo fertility of Nili Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. **Andrologia**, 51(8), e13322, 2019.

LEE, C.J.; CHEN, L.G.; LIANG, W.L.; WANG, C.C. Anti-inflammatory effects of *Punica granatum* Linne in vitro and in vivo. **Food Chemistry**, 118(2), 315–322, 2010.

LEITÃO, C.C.F.; BRITO, I.R.; FROTA, I.M.A.; SILVA, J.R.V. Importância dos fatores de crescimento locais na regulação da foliculogênese ovariana em mamíferos. **Acta Scientiae Veterinariae**, 37(3), 215–224, 2018.

LEONEL, E.C.R.; CORRAL, A.; RISCO, R.; CAMBONI, A.; TABOGA, S.R.; KILBRIDE, P.; AMORIM, C. A. Stepped vitrification technique for human ovarian tissue cryopreservation. **Scientific Reports**, 9(1), 2019.

LIU, X.; CHENG, C.; DENG, B.; LIU, M. Ellagic acid attenuates muscle atrophy in STZ-induced diabetic mice. **Physiological research**, 71(5), 631–641, 2022.

LOPEZ, J.; TAIT, S. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. **Br J Cancer** 112, 957–962, 2015.

MARCANTONINI, G.; BARTOLINI, D.; ZATINI, L.; COSTA, S.; PASSERINI, M.; RENDE, M.; LUCA, G.; BASTA, G.; MURDOLO, G.; CALAFIORE, R.; GALLI, F. Natural Cryoprotective and Cytoprotective Agents in Cryopreservation: A Focus on Melatonin. **Molecules**, 27(10), 3254, 2022.

MINISY, F.M.; SHAWKI, H.H.; EL OMRI, A.; MASSOUD, A.A.; OMARA, E.A.; METWALLY, F.G.; BADAWEY, M.A.; HASSAN, N.A.; HASSAN, N.S.; OISHI, H. Pomegranate Seeds Extract Possesses a Protective Effect against Tramadol-Induced Testicular Toxicity in Experimental Rats. **BioMed research international**, 2020.

MOGA, M. A.; DIMIENESCU, O. G.; BĂLAN, A.; DIMA, L.; TOMA, S. I.; BÎGIU, N. F., BLIDARU, A. Pharmacological and Therapeutic Properties of *Punica*

*granatum* Phytochemicals: Possible Roles in Breast Cancer. **Molecules (Basel, Switzerland)**, 26(4), 1054. 2021.

MOLLAZADEH, H.; SADEGHNIA, H.R.; HOSEINI, A.; FARZADNIA, M.; BOROUSHAKI, M.T. Effects of pomegranate seed oil on oxidative stress markers, serum biochemical parameters and pathological findings in kidney and heart of streptozotocin-induced diabetic rats. **Renal failure**, 38(8), 1256–1266. 2016.

ÑAUPAS, L.V.S.; BRITO, D.C.C.; DE SOUZA, S.S.; BRANDÃO, F.A.S.; DA SILVA, R.F.; DA SILVA, R.R.; DE OLIVEIRA, A.C.M.M.; ARAÚJO, A.A.; ALVES, B.G.; GUEDES, M.I. F.; SILVA, J.Y.G.; CORDOVA, A.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Alpha Lipoic Acid Supplementation Improves Ovarian Tissue Vitrification Outcome: An Alternative to Preserve the Ovarian Function of Morada Nova Ewe. **Reproductive science**, 28(11), 3109–3122. 2021.

NOORI, M.; JAFARI, B.; HEKMATDOOST, A. Pomegranate juice prevents development of non-alcoholic fatty liver disease in rats by attenuating oxidative stress and inflammation. **Journal of the science of food and agriculture**, 97(8), 2327–2332. 2017.

NOURI, H.; SHOJAEIAN, K.; JALILVAND, G.; KOHRAM, H. Effect of feeding pomegranate seed oil as a source of conjugated linolenic acid on Arabian stallion semen quality in cooled and postthawed condition. **Reproduction in domestic animals**, 53(5), 1075–1084. 2018.

PÉREZ-MARÍN, C.C.; REQUENA, F.D.; ARANDO, A.; ORTIZ-VILLALÓN, S.; REQUENA, F.; AGÜERA, E.I. Effect of trehalose- and sucrose-based extenders on equine sperm quality after vitrification: Preliminary results. **Cryobiology**, 80, 62–69. 2018.

QIN, Y.; JIAO, X.; SIMPSON, J. L.; CHEN, Z. J. Genetics of primary ovarian insufficiency: new developments and opportunities. **Human reproduction update**, v. 21, p. 787–808, 2015.

RAJAN, R.; MATSUMURA, K. Development and Application of Cryoprotectants. **Survival Strategies in Extreme Cold and Desiccation**, 339–354. 2018.

RESETKOVA, N.; HAYASHI, M.; KOLP, L.A.; CHRISTIANSON, M.S. Fertility Preservation for Prepubertal Girls: Update and Current Challenges. **Current obstetrics and gynecology reports**, 2(4), 218–225. 2013.

ROCHA, C.D.; SOARES, M.M.; ANTONINO, D.C.; JÚNIOR, J.M.; MOHALLEM, R.F.F.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R.; BELETTI, M.E.; JACOMINI, J.O.; ALVES, B.G.; ALVES, K.A. Positive effect of resveratrol against preantral follicles degeneration after ovarian tissue vitrification. **Theriogenology**, 114, 244–251. 2018.

RODRIGUES, A.Q.; PICOLO, V.L.; GOULART, J.T.; SILVA, I.M.G.; RIBEIRO, R.B.; AGUIAR, B.A.; FERREIRA, Y.B.; OLIVEIRA, D.M.; LUCCI, C.M.; DE BEM, A.F. PAULINI, F. Metabolic activity in cryopreserved and grafted ovarian tissue using high-resolution respirometry. **Scientific reports**, 11(1), 21517. 2021.

SALINGER-MARTINOVIC, S.; COSIC, V.; STOJILJKOVIC, N.; ILIC, S.; STOJANOVIC, N.; DENCIC, T. Impact of ellagic acid application on doxorubicin-induced cardiovascular toxicity model. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, 99(2), 185–191. 2021.

SANFINS, A.; RODRIGUES, P.; ALBERTINI, D.F. GDF-9 and BMP-15 direct the follicle symphony. **Journal of assisted reproduction and genetics**, 35(10), 1741–1750. 2018.

SHEIKHI, M.; HULTENBY, K.; NIKLASSON, B.; LUNDQVIST, M.; HOVATTA, O. Preservation of human ovarian follicles within tissue frozen by vitrification in a xeno-free closed system using only ethylene glycol as a permeating cryoprotectant. **Fertility and Sterility**, 100(1), 170–177.e2. 2013.

SIEGEL, R.L.; MILLER, K.D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin* 70:7–30. 2020.

SILVA, B.R.; SILVA, J.R.V. Mechanisms of action of non-enzymatic antioxidants to control oxidative stress during *in vitro* follicle growth, oocyte maturation, and embryo development. **Animal reproduction science**, 249, 107186. 2022.

SILVA, L.M.; MBEMYA, G.T.; GUERREIRO, D.D.; BRITO, D.C.C.; DONFACK, N.J.; MORAIS, M.L.G.S.; RODRIGUES, G.Q.; BRUNO, J.B.; ROCHA, R.M.P.; ALVES, B.G.; APGAR, G.A.; CIBIN, F.W.S.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Effect of Catalase or Alpha Lipoic Acid Supplementation in the Vitrification Solution of Ovine Ovarian Tissue. **Biopreservation and biobanking**, 16(4), 258–269. 2018.

SOUZA, S.S.; AGUIAR, F.L.N.; ALVES, B.G.; ALVES, K.A.; BRANDÃO, F.A.S.; BRITO, D.C.C.; RAPOSO, R.D.S.; GASTAL, M.O.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R.; TEIXEIRA, D.Í.A.; GASTAL, E.L. Equine ovarian tissue xenografting: impacts of cooling, vitrification, and VEGF. **Reproduction & fertility**, 2(4), 251–266. 2021.

SPARKS, A. Human embryo cryopreservation—methods, timing, and other considerations for optimizing an embryo cryopreservation program. **Seminars in reproductive medicine**, v.33, p. 128–144, 2015.

SUN, W.; YAN, C.; FROST, B.; WANG, X.; HOU, C.; ZENG, M.; GAO, H.; KANG, Y.; & LIU, J. Pomegranate extract decreases oxidative stress and alleviates mitochondrial impairment by activating AMPK-Nrf2 in hypothalamic paraventricular nucleus of spontaneously hypertensive rats. **Scientific reports**, 6, 34246. 2016.

TURRENS, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*, 335-344, 2003.

VAN DER POL, A.; VAN GILST, W.H.; VOORS, A.A.; VAN DER MEER, P. Treating oxidative stress in heart failure: past, present and future. **European journal of heart failure**, 21(4), 425–435, 2019.

VANORNY DA, MAYO KE. The role of Notch signaling in the mammalian ovary. **Reproduction**, 2017.



VILADOMIU, M.; HONTECILLAS, R.; LU, P.; BASSAGANYA-RIERA, J. Preventive and prophylactic mechanisms of action of pomegranate bioactive constituents. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013.

WHALEY, D., DAMYAR, K., WITEK, R. P., MENDOZA, A., ALEXANDER, M., & LAKEY, J. R. Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations. **Cell transplantation**, 30, 2021.

YAYLA, M.; CETIN, D.; ADALI, Y.; KILICLE, P. A.; TOKTAY, E. Potential therapeutic effect of pomegranate seed oil on ovarian ischemia/reperfusion injury in rats. **Iranian journal of basic medical sciences**, 21(12), 1262–1268. 2018.

YAYLA, M.; CETIN, D.; ADALI, Y.; KILICLE, P.A.; TOKTAY, E. Potential therapeutic effect of pomegranate seed oil on ovarian ischemia/reperfusion injury in rats. **Iranian journal of basic medical sciences**, 21(12), 1262–1268. 2018.

YONG, K. W., LAOUAR, L., ELLIOTT, J. A. W., & JOMHA, N. M. Review of non-permeating cryoprotectants as supplements for vitrification of mammalian tissues. **Cryobiology**, 2020.

ZHOU, J.; PENG, X.; MEI, S. Autophagy in Ovarian Follicular Development and Atresia. **International journal of biological sciences**, 15(4), 726–737. 2019.

ZOHEIR, K. M.; DARWISH, A. M.; LIGUO, Y.; ASHOUR, A. E. Transcriptome comparisons detect new genes associated with apoptosis of cattle and buffaloes preantral follicles. **Journal, genetic engineering & biotechnology**, 19(1), 151. 2021.