



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA - RENORBIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MARIA AMÉLIA ARAÚJO SOARES COSTA

AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DA FRUTALINA (LECTINA DE *Artocarpus incisa* L.) NO CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIOS CAPRINOS

FORTALEZA

2017

MARIA AMÉLIA ARAÚJO SOARES COSTA

AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DA FRUTALINA (LECTINA DE *Artocarpus incisa*
L.) NO CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Agropecuária.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Viana Silva

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

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

- C874a Costa, Maria Amélia Araújo Soares.
Avaliação do efeito citotóxica da frutalina (lectina de *Artocarpus incisa* L.) no cultivo in vitro de folículos pré-antrais caprinos / Maria Amélia Araújo Soares Costa. – 2017.
134 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de Biotecnologia), Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. José Roberto Viana Silva.

1. Frutalina. 2. Cultivo Celular. 3. Folículo Ovariano Caprino. 4. Toxicidade. I. Título.

CDD 660.6

MARIA AMÉLIA ARAÚJO SOARES COSTA

AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DA FRUTALINA (LECTINA DE *Artocarpus incisa*
L.) NO CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Agropecuária.

Aprovado em: 28/ 07/ 2017

Prof. Dr. Rafael Rosseto
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva
Universidade Federal Rural do Semi Árido (UFERSA)

Profa. Dra. Valdevane Rocha Araújo
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Profa. Dra. Márcia Viviane Alves Saraiva
Universidade Federal Rural do Semi Árido (UFERSA)

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

A Deus,

A minha querida família,

E a meu amado esposo, Jackson Costa, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, esta força maior que move minha vida. Por seu amor incondicional; por ter me presenteado com o dom da vida; por cuidar de mim em todos os momentos, em especial naqueles em que eu não tinha mais forças para prosseguir; por ter escrito a minha história de forma tão maravilhosa. Obrigado meu Deus, por todas as conquistas, por todas as pessoas especiais que fazem parte da minha vida, enfim obrigada por tudo.

Aos meus queridos pais João Elmiro Soares e Maria Amélia Araújo Soares. Agradeço por todo amor, por todo carinho, por todo cuidado e por toda a educação dada. Por terem feito de mim a pessoa que sou hoje. Sou muito feliz por ter sido escolhida por Deus para ser a filha caçula de vocês. Vocês são as razões da minha vida, minha força, minha inspiração, meu aconchego. Amo vocês infinitamente.

A meus irmãos Otacílio Araújo Soares, Orlene Maria Araújo Costa, Wilton Araújo Soares, Lourenço Ferreira Araújo Neto, João Sérgio Araújo Soares, Maria Marcigleide Araújo Soares e Olga Maria Araújo Soares (madrinha). Por terem cuidado de mim, por serem para mim bons exemplos de homens e mulheres, por todos os momentos compartilhados. Vocês são essenciais na minha vida.

A meu esposo José Jackson do Nascimento Costa, um presente que Deus me deu. Obrigada pelo companheirismo, pela compreensão, pelos ensinamentos e por todos os conselhos dados em todo esse período que já vivemos juntos. Por acreditar em mim e por me fazer acreditar que sou capaz. Por ser meu melhor amigo, por me ouvir sempre. Minha vida é muito mais completa com você. Sou muito mais feliz com você. Você me fez acreditar que realmente vale a pena esperar em Deus. Te Amo.

Ao Professor Dr. José Roberto Viana Silva pela orientação dada, por ter me aceitado como aprendiz no seu laboratório, pela confiança e pelos ensinamentos. Muito obrigada!

Aos amigos Laís Raiane Feitosa Melo Paulino, Anderson Weiny Barbalho Silva, Ellen de Vasconcelos da Cunha, Gisvani Lopes de Vasconceloso, Regislane Pinto Ribeiro e José Jackson do Nascimento Costa, por toda a ajuda dada para a realização deste trabalho. Serei sempre grata.

Ao Prof. Dr. Robert van den Hurk pela contribuição na redação dos trabalhos.

Aos queridos amigos integrantes e ex- integrantes do grupo de pesquisa de Reprodução e Cultura de Células e Tecidos da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará – UFC, campus Sobral: Anderson Weiny Barbalho Silva, Ellen de Vasconcelos da Cunha, Francisco Taiã Gomes Bezerra, Glaucinete Borges Souza, Laís Raiane Feitosa Melo Paulino, Edilcarlos Max, Pedro Alves, Miguel Fernandes, Laryssa Barrozo, Bianca Silva, Regislane Pinto Ribeiro, Gisvani Lopes de Vasconceloso e José Renato Sousa Passos pelas alegrias e conhecimentos compartilhados, pelos momentos de descontração e de conversas jogadas fora, por toda ajuda dada durante os meus experimentos. Muito obrigada!

Ao Professor Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha, pelo incentivo dado aos meus primeiros passos na pós-graduação e a toda equipe do Laboratório de Genética Molecular do NUBIS.

À banca pela participação, trazendo sua colaboração para o aprimoramento e enriquecimento desta tese.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - Rede Nordeste de Biotecnologia – Renorbio, na pessoa do coordenador Prof. Dr. Arlindo Moura e aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, com os quais tive a oportunidade de ampliar meus conhecimentos.

Aos funcionários da Faculdade de Medicina de Sobral pela convivência, atenção e disponibilidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do nosso projeto.

A todos que de alguma forma contribuíram na minha formação, meu muito obrigada, pois acredito que NÃO CONQUISTAMOS NADA SOZINHOS, por isso minha gratidão a todos.

“Espere menos, queira menos. Nem sempre o mais é sinônimo de adição. Recuar é tão necessário quanto ir adiante. Diminuir as expectativas pode nos ajudar a entender melhor a realidade. A vida é sempre boa, mesmo sendo imperfeita.”

(Pe. Fabio de Melo)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da frutalina (lectina de *Artocarpus incisa* L.) sobre a ativação, sobrevivência, ultraestrutura e expressão gênica dos folículos pré-antrais caprinos cultivados *in situ* e sobre o cultivo *in vitro* de folículos secundários caprinos isolados. Para a fase I, fragmentos ovarianos caprinos foram cultivadas durante 6 dias em α -MEM⁺ sozinho ou suplementado com frutalina (1, 10, 50, 100 ou 200 μ g/mL). Os fragmentos ovarianos não-cultivados (controle fresco) e cultivados foram destinados a análise histológica, ultraestrutural e de expressão dos genes anti- e pró-apoptóticos por qPCR. Para a fase II, folículos secundários foram microdissecados e cultivados por 6 dias em meio α -MEM⁺ sozinho ou suplementado com doxorrubicina (0,3 μ g/mL) ou frutalina (0,6, 6 ou 60 μ g/mL). Após o cultivo, folículos secundários foram analisados quanto à sobrevivência, crescimento, formação de antro e expressão dos genes anti- e pró-apoptóticos por qPCR. Na fase I, a frutalina em todas as concentrações testadas não influenciou na ativação de folículos primordiais, mas reduziu a sobrevivência folicular. As concentrações mais elevadas da frutalina (50, 100 ou 200 μ g/mL) reduziram a sobrevivência folicular, quando comparadas com os tecidos cultivados com 1 ou 10 μ g/mL de frutalina. A análise ultra-estrutural mostrou que após o cultivo os folículos atresícos apresentavam oócitos retraídas e um grande número de vacúolos distribuídos por todo o citoplasma. Também, verificou-se que apesar de um efeito dose-resposta não ter sido observado na expressão gênica, quando comparado com tecido cultivado no meio controle, a presença da frutalina aumentou a expressão do RNAm de genes pró-apoptóticos. Na fase II, a doxorrubicina e a frutalina (0,6, 6 e 60 μ g / mL) reduziram significativamente a percentagem de folículos normais quando comparado com o meio α -MEM⁺. A doxorrubicina reduziu a viabilidade folicular quando comparado com a frutalina em todas as concentrações testadas. Além disso, a porcentagem de folículos normais após o cultivo com frutalina (0,6 e 6,0 μ g/mL) foi maior do que na presença de 60,0 μ g/mL ($p < 0,05$). Com exceção dos folículos cultivados com 0,6 μ g/mL de frutalina, a taxa de crescimento folicular foi reduzida após o cultivo na presença de doxorrubicina ou frutalina, quando comparada com o meio controle ($p < 0,05$). Cerca de 60,0% dos folículos cultivados em α -MEM⁺ apresentaram formação de antro, mas a presença de doxorrubicina ou frutalina reduziu a formação de antro ($P < 0,05$). A presença de doxorrubicina ou de frutalina (60,0 μ g/mL) aumentou o nível de RNAm para *CASP3*, *CASP6*, *BAX* e *BCL2* ($P < 0,05$), mas os maiores níveis de

transcritos para *CASP3*, *CASP6*, *BAX* foram encontrados em folículos cultivados com doxorubicina, quando comparados com aqueles cultivados em frutalina (60,0 µg/mL). Por outro lado, os folículos cultivados com frutalina apresentaram níveis mais altos de RNAm para *BCL2* (P <0,05), quando comparados com aqueles cultivados na presença de doxorubicina. Em conclusão, a frutalina não influencia na ativação dos folículos primordiais *in vitro*, e mantém uma elevada percentagem de folículos saudáveis (> 60%) quando usada em baixas concentrações (1 e 10 µg/mL). Também, as características ultraestruturais dos folículos cultivados mostram que a necrose é a principal via de morte celular. Além disso, a frutalina tem efeitos tóxicos mais baixos do que a doxorubicina em folículos secundários caprinos cultivados *in vitro*.

Palavras-chave: Frutalina. Cultivo Celular. Foliculo Ovariano Caprino. Toxicidade

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the effect of frutalin (lectin of *Artocarpus incisa* L.) on the activation, survival, ultrastructure and gene expression of preantral follicles grown *in situ* and on *in vitro* culture of isolated goat secondary follicles. For phase I, goat ovarian fragments were cultured for 6 days in α -MEM + alone or supplemented with frutalin (1, 10, 50, 100 or 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The uncultured (fresh control) and cultured ovarian fragments were intended for histological, ultrastructural analysis and expression of anti-and pro-apoptotic genes by qPCR. For phase II, secondary follicles were microdissected and cultured for 6 days in α -MEM + medium alone or supplemented with doxorubicin (0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or frutalin (0.6, 6 or 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$). After culturing, secondary follicles were analyzed for survival, growth, antrum formation and expression of anti-and pro-apoptotic genes by qPCR. In phase I, frutalin at all concentrations tested did not influence the activation of primordial follicles, but reduced follicular survival. Higher concentrations of frutalin (50, 100 or 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) reduced follicular survival when compared to tissues cultured with 1 or 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ frutalin. Ultrastructural analysis showed that after cultivation the atretic follicles had retracted oocytes and a large number of vacuoles distributed throughout the cytoplasm. Also, it was found that although a dose-response effect was not observed in the gene expression, when compared to tissue cultured in the control medium, the presence of frutalin increased the mRNA expression of pro-apoptotic genes. In phase II, doxorubicin and frutalin (0.6, 6 and 60 $\mu\text{g} / \text{mL}$) significantly reduced the percentage of normal follicles when compared to α -MEM + medium. Doxorubicin reduced follicular viability when compared to frutalin at all concentrations tested. In addition, the percentage of normal follicles after frutalin (0.6 and 6.0 $\mu\text{g} / \text{mL}$) was higher than in the presence of 60.0 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ($p < 0.05$). With the exception of follicles cultivated with 0.6 $\mu\text{g} / \text{mL}$ frutalin, the follicular growth rate was reduced after cultivation in the presence of doxorubicin or frutalin when compared to the control medium ($p < 0.05$). Approximately 60.0% of follicles cultured in α -MEM + presented antrum formation, but the presence of doxorubicin or frutalin reduced the formation of antrum ($P < 0.05$). The presence of doxorubicin or frutalin (60.0 $\mu\text{g} / \text{mL}$) increased the mRNA level for CASP3, CASP6, BAX and BCL2 ($P < 0.05$), but the highest levels of transcripts for CASP3, CASP6, BAX were found in follicles cultured with doxorubicin when compared to those grown in frutalin (60.0 $\mu\text{g} / \text{mL}$). On the other hand, follicles cultivated with frutalin had higher levels of mRNA

for BCL2 (P <0.05) when compared to those cultured in the presence of doxorubicin. In conclusion, frutalin does not influence the activation of the primordial follicles *in vitro*, and maintains a high percentage of healthy follicles (> 60%) when used in low concentrations (1 and 10 µg / mL). Also, the ultrastructural characteristics of cultured follicles show that necrosis is the main pathway of cell death. In addition, frutalin has lower toxic effects than doxorubicin in *in vitro* cultured goat secondary follicles.

Keywords: Frutalina. Cell Culture. Follicle Ovarian Goat. Toxicity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Classificação estrutural das lectinas vegetais. Representação esquemática de merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas.	25
Figura 2 -	Modelo tetramérico da lectina frutalina mostrando a presença de quatro monômeros.	29
Figura 3 -	Os alvos dos agentes quimioterápicos no tecido ovariano.	35
Figura 4 -	Caracterização morfológica da foliculogênese, desde a formação do folículo primordial ao estágio ovulatório.	37
Figura 5 -	Classificação, organização e estrutura dos folículos ovarianos. Notar a sequência evolutiva desde os folículos primordiais até a formação da cavidade antral e ovulação.	38
Figura 6 -	Comunicação entre o oócito (OO) e as células da granulosa (CG) através da sinalização parácrina (setas curvas) e por junções comunicantes (junções- <i>gap</i>) (seta reta pontilhada).....	40
Figura 7 -	Métodos de Isolamento e de Cultivo <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais.....	42
Figura 8 -	Representação esquemática das características morfológicas da morte celular por apoptose.	44
Figura 9 -	Via extrínseca da apoptose mediada pelo receptor tipo I do TNF (TNFR1).....	46
Figura 10 -	Via intrínseca (mitocondrial) da apoptose.	47
Figura 11 -	Representação esquemática das características morfológicas da morte celular por necrose.....	48
Figura 12 -	Resumo esquemático da necroptose mediada pelo fator de necrose tumoral α (TNF α).....	50
Figura 13 -	Histological section of uncultured tissue showing a normal primordial follicle (A) and a degenerated primary follicle (B). Degenerated follicle had a shrunken oocyte, with pyknotic nucleus or disorganized granulosa cells.	82
Figura 14-	Percentages of normal follicles in fresh control and after culture in α -MEM ⁺ supplemented with frutalin (1, 10, 50, 100 or 200 μ g/mL). Follicle counts from a total of six goats were pooled.	83
Figura 15 -	Percentages of follicles in fresh control and after culture in α -MEM ⁺ supplemented with frutalin (1, 10, 50, 100 or 200 μ g/mL). Follicle counts from a	84

	total of six goats were pooled. A) primordial follicles; B) developing follicles.	
Figura 16 -	Electron micrograph of a normal primordial follicle from uncultured tissue.	85
Figura 17 -	Detail of an oocyte from uncultured tissue with nucleus and cytoplasmic organelles.....	86
Figura 18 -	Electron micrograph of a normal primordial follicle from cultured tissue in α -MEM ⁺ only.....	87
Figura 19 -	Detail of an oocyte from primordial follicle from cultured tissue in α -MEM ⁺ only with nucleus and cytoplasmic organelles	88
Figura 20 -	Connections (arrows) between oocyte and granulosa from primordial follicles present in cultured tissue in α -MEM ⁺ only	89
Figura 21 -	Electron micrograph of a degenerated primordial follicle from tissue cultured in presence of frutalin (100 μ g/mL).	90
Figura 22-	Levels of mRNA for <i>TNFA</i> , <i>TNFR1</i> , <i>TNFR2</i> , <i>CASPASE 3</i> , <i>CASPASE 6</i> , <i>BAX</i> and <i>BCL2</i> in tissues cultured in α -MEM ⁺ when compared with fresh uncultured tissues.	91
Figura 23 -	Levels of mRNA for pro apoptotic genes in tissues cultured in α -MEM ⁺ supplemented with frutalin. A) TNF- α ; B) TNFR1; C) TNFR2; D) CASPASE 3; E) CASPASE 6; F) BAX; G) BCL2.....	92
Figura 24 -	Viable goat secondary follicles cultured for 6 days evaluated by light microscopy (100x magnification) and after staining with calcein-AM (green) and ethidium homodimer-1 (red). Secondary follicle cultured in α -MEM ⁺ alone (A, B) or supplemented with doxorubicin (C, D) or frutalin at concentrations of 0.6 (E, F) 6.0 (G, H) and 60.0 μ g/mL(I, J). Scale bars represent 100 μ m.....	115
Figura 25 -	Levels of mRNA for <i>BAX</i> (A); <i>CASP3</i> (B), <i>CASP6</i> (C) and <i>BCL2</i> (D) in secondary follicles (mean \pm SD) cultured in vitro for 6 days. ^{a,b,c} Significant difference between treatments (P < 0.05).	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Efeito citotóxico e anticancerígeno de algumas lectinas de plantas.....	32
Tabela 2 -	Agentes quimioterápicos e seus principais alvos no ovário.....	34
Tabela 3 -	Primer pairs used in real-time PCR.....	81
Tabela 4 -	Primer pairs used in real-time PCR.....	112
Tabela 5 -	Percentage of morphologically normal secondary follicles, and antrum formation after <i>in vitro</i> culture for 6 days in α -MEM ⁺ alone or supplemented with doxorubicin or different concentrations of frutalin (0.6, 6.0 and 60.0 μ g/mL).....	113
Tabela 6 -	Follicular diameter (on day 0 and 6) and growth rate (mean \pm SEM) of isolated secondary follicles after <i>in vitro</i> culture in α -MEM ⁺ or supplemented with, doxorubicin or different concentrations of frutalin (0.6, 6.0 and 60.0 μ g/mL).....	114

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

	Português	Inglês
A1	Anexina 1	Annexin 1
ADP	Adenosina Difosfato	Adenosine Diphosphate
APAF-1	Fator de Ativação de Protease associada à apoptose 1.	Apoptotic protease activating factor 1
ATP	Adenosina Trifosfato	Adenosine Triphosphate
Bad	Antagonista de Bcl-2 de morte celular	BCL-2 antagonist of cell death
Bak	Proteína Antagonista da BCL 2	BCL2 antagonist killer 1
Bax	Proteína X Associada a BCL-2	BCL2-Associated X Protein
Bcl-2	Célula-B de linfoma 2	B-cell lymphoma protein 2
Bcl-2	Célula-B de linfoma 2	BCL-2 like 2 protein
Bcl-w	Membro da família Bcl-2	Member of the bcl-2 family
Bcl-Xl	Linfoma de Células B Extra Grande	B-cell lymphoma-extra large
BH1	Domínio 1 homólogo ao Bcl-2	Bcl-2 homology domains 1
BH2	Domínio 2 homólogo ao Bcl-2	Bcl-2 homology domains 2
BH3	Domínio 3 homólogo ao Bcl-2	Bcl-2 homology domains 3
BH4	Domínio 4 homólogo ao Bcl-2	Bcl-2 homology domains 4
Bid	Agonista de Morte que interage com o domínio BH3	BH3 interacting domain death agonist
Bik	Assassino que interage com Bcl-2	Bcl-2-Interacting Killer
Bim	Mediador da morte celular que interage	BCL-2-interacting mediator of cell death
Bmf	Fator Modificador De Bcl-2	BCL-2 modifying factor
BSA	Albumina Sérica Bovina	Bovine Serum Albumin
Ca ⁺	Cálcio	Calcium
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio	Calcium Chloride
cDNA	DNA complementar	Complementary DNA
CG	Células da Granulosa	Granulosa cells
CGPs	Células Germinativas Primordiais	Primordial Germ Cells

cIAP1/2	Proteínas 1 e 2 inibidoras da apoptose celular	Cellular inhibitor of apoptosis protein 1 and 2
Con-A	Concanavalina-A	Concanavalin-A
CYLD	Supressor de Tumor Deubiquitinase	Tumor Suppressor Deubiquitinase
CYP11A1	Citocromo P450, família 11, subfamília A, membro 1	Cytochrome P450 Family 11 Subfamily A Member 1
CO ₂	Dióxido de Carbono	Carbon Dioxide
DD	Domínio de Morte	Death Domain
DFF40	Fator de Fragmentação do DNA – subunidade 40	DNA fragmentation factor subunit 40
DFF40/CAD	Caspase Ativadora de DNase	Caspase-Activated DNase
DFF45	Fator de Fragmentação do DNA – subunidade 45	DNA fragmentation factor subunit 45
DISC	Complexo Sinalizador Indutor da Morte	Death-Inducing Signaling Complex
DMEM-F12	Meio Eagle Modificado por Dulbecco/Mistura Nutriente F -12	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
DNA	Ácido Desoxirribonucléico	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Deoxinucleotide	Deoxynucleotide
DR4	Receptor de Morte 4	Death receptor 4
DR5	Receptor de Morte 5	Death receptor 5
DTT	Ditiotreitol	Dithiothreitol
E2	Estradiol	Estradiol
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FADD	Domínio de Morte Associado a faz	Fas-Associated protein Death Domain
FasL	Fas Ligante	Fatty acid synthetase ligant
Faz	Receptor de Morte da Superfície Celular Faz	Fas cell surface death receptor
FLIP	Proteína Inibidora de FLICE	FLICE-like Inhibitory Protein

FOP	Falência ovariana prematura	
FSH	Hormônio Folículo Estimulante	Follicle Stimulating Hormone
FSHR	Receptor do Hormônio Folículo Estimulante	Follicle-stimulating hormone receptor
FTL	Frutalina	Frutalin
GAS2	Proteína 2 específica de interrupção do crescimento	Growth arrest-specific protein 2
GlcNAc	N-acetilglicosamina	N-Acetylglucosamine
H	Horas	Hours
HEPES	4 - (2-hidroxietil)-1- ácido piperazinoetanosulfônico	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
Hrk	Ativador de Apoptose harakiri	Activator of apoptosis harakiri
IKK $\alpha/\beta/\gamma$	Inibidor do fator nuclear kappa B quinase subunidades $\alpha/\beta/\gamma$	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit $\alpha/\beta/\gamma$
IL-2	Interleucina 2	Interleukin 2
IL-2R	Receptor de Interleucina 2	Interleukin 2 receptor
ITS	Insulina-Transferrina-Selênio	Insulin-Transferrin-Selenium
I κ B	Inibidor de kappa Beta	Inhibitor of kappa B
kDa	Quilodalton	Kilodalton
LH	Hormônio Luteinizante	Luteinizing Hormone
Mcl-1	Célula Mielóide de leucemia-1	Myeloid Cell Leukemia 1
MEM	Meio Essencial Mínimo	Minimum Essential Medium
MET	Microscopia eletrônica de transmissão	Transmission Electron Microscopy
Min	Minutos	Minutes
MLKL	Proteínas de domínio quinase de linhagem mista	Mixed lineage kinase domain-like protein
MOIFOPA	Manipulação de Oócitos Inclusos em Foliculos Ovarianos Pré-Antrais	Oocytes manipulation enclosed in preantral ovarian follicles
NaCl	Cloreto de Sódio	Cloreto de Sódio
NF-kB	Fator Nuclear kappa Beta	Factor Nuclear kappa B

NF-κB p50	Fator Nuclear kappa B p50	Factor Nuclear kappa B p50
P4	Progesterona	Progesterone
p65/RelA	Subunidade do NF-κB	Subunit NF-κB
PARP	Poli polimerase (ADP-ribose)	Poly (ADP-ribose) polymerase
PAS	Ácido periódico de Schiff	Periodic acid-Schiff
Pb	Pares de base	Base pairs
PBS	Tampão fosfato-salino	Phosphate-buffered saline
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase	Polymerase Chain Reaction
PDB	Banco de Dados de Proteínas	Protein Data Bank
pH	Potencial hidrogeniônico	Hydrogen potential
PHA	Fitohemaglutinina	Phytohemagglutinin
PI3K/Akt	Fosfatidilinositol-3-quinase/serina-treonina quinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PPL-2	Lectina 2 de <i>Parkia platycephala</i>	<i>Parkia platycephala</i> lectin 2
Puma	p53 Upregulated Modulator of Apoptosis	Modulador de Apoptose por upregulação de p53
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa	Polymerase Chain Reaction Quantitative
RIP1	Proteína de Interação com o receptor 1	Receptor Interacting Protein 1
RIP2	Proteínas inativadoras de ribossomos tipo 2	Ribosome inactivating protein 2
RIP3	Proteína Quinase de Interação com Receptor-3	Receptor-interacting protein kinase 3
RNA	Ácido Ribonucléico	Ribonucleic Acid
RNAm	RNA mensageiro	Messenger RNA
ROCK-1	Proteína quinase 1 contendo coiled-coil associado a Rho	Rho-associated protein kinase 1
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio	Reactive Oxygen Species

S	Segundos	Seconds
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na presença de Dodecil Sulfato de Sódio	Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
StAR	Proteína Reguladora Aguda da Esteroidogênese	Steroidogenic Acute Regulatory Protein
TNF	Fator de Necrose Tumoral	Tumor necrosis factor
TNFR1	Receptor I do Fator de Necrose Tumoral	Tumor necrosis factor receptor I
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa	Tumor Necrosis Factor-[alpha]
TRADD	Proteína com domínio de morte associada ao TNFR1	Tumor necrosis factor receptor type 1-associated Death domain protein
TRAF2	Fator 2 Associado a Receptor de TNF	TNF receptor-associated factor 2
TRAIL	Ligante Indutor de Apoptose Relacionado ao Fator de Necrose Tumoral	TNF-Related Apoptosis Inducing ligant
U	Unidades	Units
UI	Unidades Internacionais	International units
VG	Vesícula Germinativa	Germinal Vesicle
α -MEM	Meio Essencial Mínimo alfa	Minimum Essential Medium alpha

LISTA DE SÍMBOLOS

	Português	Inglês
-	Menos	Less
%	Porcentagem	Percentage
<	Menor que	Less than
>	Maior que	Higher than
µg	Micrograma	Microgram
µL	Microlitro	Microliter
µm	Micrometro	Micrometer
µM	Micromolar	Micromolar
cm	Centímetro	Centimeter
Ct	Limiar do ciclo	Cycle threshold
G	Gramas	Grams
L	Litro	Liter
M	Molar	Molar
mL	Mililitro	Milliliter
Mm	Milímetro	Millimeter
mM	Milimolar	Millimolar
mm ³	Milímetro cúbico	Millimeter Cubic
mOsm	Miliosmol	Miliosmol
Nm	Nanômetro	Nanometer
°C	Graus Celsius	Degrees Celsius
w/v	Massa/ volume	Mass / volume
A	Alfa	Alfa
B	Beta	Beta
Γ	Gama	Gamma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DE LITERATURA	24
3	JUSTIFICATIVA	51
4	HIPÓTESES CIENTÍFICAS	53
5	OBJETIVOS	54
6	EFFECTS OF FRUTALIN ON EARLY FOLLICLE MORPHOLOGY, ULTRASTRUCTURE AND GENE EXPRESSION IN CULTURED GOAT OVARIAN CORTICAL TISSUE	55
7	FRUTALIN IS LESS TOXIC THAN DOXORUBICIN DURING THE CULTURE OF CAPRINE SECONDARY FOLLICLES <i>IN VITRO</i>	87
8	CONCLUSÕES	108
9	PERSPECTIVAS	109
	REFERÊNCIAS	110

1 INTRODUÇÃO

Atualmente novas drogas têm sido procuradas com o objetivo de aumentar o índice de cura ou tratamento de várias doenças, incluindo o câncer. Segundo Orlando (2005), as plantas são excelentes fontes de matéria-prima, possuindo uma diversidade molecular superior àquela derivada dos processos de síntese química. As plantas têm se tornado cada vez mais reconhecidas pelo seu potencial terapêutico, sendo que o estudo de suas atividades farmacológicas é muito importante a fim de se comprovar a validade do seu uso popular (BEN-NASR *et al.*, 2013).

Entre os produtos extraídos de plantas com possível potencial terapêutico, tem-se as lectinas. Segundo Peumans e Van Damme (1995), as lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune (vegetais) que têm no mínimo um sítio de ligação não catalítico, chamado domínio lectina, que reconhece de forma reversível e específica mono- e oligossacarídeos, sem alterar a estrutura covalente de quaisquer de seus ligantes. Assim, as lectinas reconhecem moléculas presentes nas membranas celulares e influenciam as interações célula-célula, a comunicação, a proliferação e a morte celular (SHARON, 2008).

Diversas lectinas são conhecidas por apresentarem propriedades anticancerígenas *in vitro* e *in vivo*. Entre estas lectinas tem-se a frutalina, uma lectina das sementes da fruta-pão de caroço (*Artocarpus incisa* L.), a qual mostrou apresentar efeito antiploriferativo sobre células HeLa derivadas de câncer cervical humano (OLIVEIRA *et al.*, 2011), além de apresentar considerável potencial para diferenciar alterações neoplásicas de lesões benignas da próstata humana (OLIVEIRA *et al.*, 2009a). Porém, ainda não se sabe os efeitos que esta lectina pode exercer sobre as células germinativas femininas, e conseqüentemente, sobre a fertilidade da mulher.

Como preconiza a toxicologia, toda substância, mesmo sendo de origem natural, pode ser considerada um agente tóxico, dependendo das condições de exposição, como dose administrada ou absorvida, tempo e frequência de exposição e vias de administração (BARROS E DAVINO, 1996). Além disso, as plantas podem apresentar, na sua constituição, substâncias capazes de causar efeitos adversos no organismo, que podem interferir com o funcionamento de órgãos vitais.

Por isso, os fitoterápicos sofrem uma grande restrição quanto ao uso e aceitação, devido ao reduzido número de estudos que comprovam sua ação biológica e segurança quanto a

efeitos tóxicos agudos, crônicos ou sobre a reprodução (SHARAPIN, 1999). Dentre os critérios de segurança necessários estão os estudos sobre a toxicidade reprodutiva dos produtos fitoterápicos, que incluem uma avaliação das ações sobre a fertilidade e a performance reprodutiva para os produtos administrados durante a gametogênese e fecundação; elucidação dos efeitos adversos sobre os fetos durante a vida intra e extra-uterina para os produtos administrados durante a gestação; e determinação dos efeitos adversos sobre a mãe, o parto e o desenvolvimento pós-natal para os produtos administradas neste período (BRASIL, 1996).

A avaliação da eficácia e toxicidade de possíveis produtos farmacêuticos é realizada com maior frequência com o uso de testes *in vivo*, porém a avaliação da citotoxicidade de compostos fitoterápicos vem passando por um processo de reformulação, em que parte desse processo contempla a substituição dos testes *in vivo* pelos *in vitro*, uma vez que os primeiros são testes demorados, caros e que necessitam de um grande número de animais de laboratório. Diante do exposto, a biotécnica de manipulação de oócitos e folículos pré-antrais (MOIFOPA/Ovário Artificial) é uma técnica que pode ser utilizada como alternativa para avaliar o efeito de diversos produtos, incluindo possíveis drogas antineoplásicas, sobre a sobrevivência e desenvolvimento das células ovarianas, uma vez que por esta se tratar de um modelo exclusivamente *in vitro*, pode contribuir para o bem-estar animal (redução do estresse), reduzindo o uso de animais em testes experimentais. Dessa forma, os estudos iniciais sobre as ações da frutalina sobre a sobrevivência e desenvolvimento folicular foram realizados utilizando a biotécnica MOIFOPA, por meio do cultivo *in vitro* dos folículos ovarianos caprinos.

Para um maior esclarecimento da importância deste trabalho, a revisão de literatura a seguir abordará aspectos relacionados à diversidade de lectinas vegetais; caracterização e função da frutalina (lectina das sementes de *Artocarpus incisa* L.); aplicação das lectinas no diagnóstico e terapia do câncer; toxicidade dos agentes quimioterápicos sobre os gametas femininos; formação e crescimento dos folículos ovarianos; métodos de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais e tipos de morte celular (apoptose e necrose).

2 REVISÃO DE LITERATURA

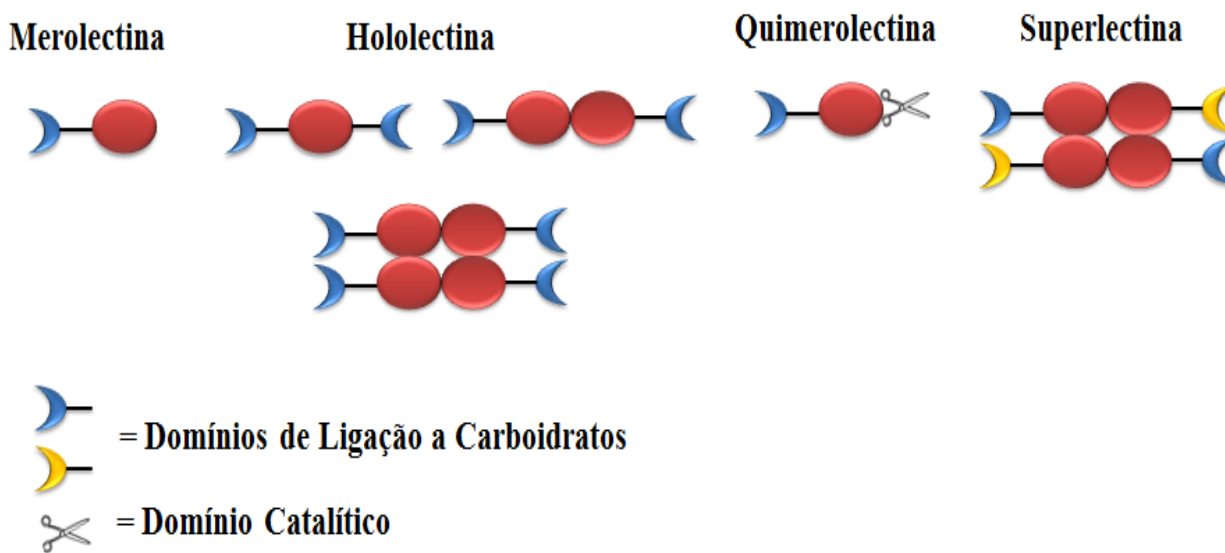
Lectinas Vegetais

As lectinas são proteínas de origem não imune, que apresentam pelo menos um domínio não catalítico, conhecidas por reconhecer e se ligar de forma específica e reversível a carboidratos (mono- ou oligossacarídeos) e glicoconjugados na superfície celulares, sem alterar a estrutura química dos mesmos (BIES; LEHR; WOODLEY, 2004; PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Com base em suas estruturas moleculares as lectinas são divididas em quatro grupos principais: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (VAN DAMME *et al.*, 1998).

As merolectinas são proteínas que são formadas apenas por uma cadeia polipeptídica apresentando somente um domínio de ligação a carboidratos. Estas lectinas são incapazes de precipitar glicoconjugados e aglutinar células. A heveína, uma proteína do látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*), que se liga a quitina é uma representante deste grupo (VAN PARIJS *et al.*, 1991). As hololectinas são proteínas que apresentam dois ou mais sítios homólogos de ligação a carboidratos, que se ligam ao mesmo açúcar ou outro estruturalmente similar. As lectinas pertencentes a este grupos são capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. A maioria das lectinas de plantas é classificada como hololectina devido a sua atividade hemaglutinante. De acordo com Peumans e Van Damme (1995), a frutalina é definida como uma hololectina. As quimerolectinas são proteínas compostas por um domínio ligante a carboidrato e outro domínio não relacionado, podendo apresentar atividade catalítica bem definida, ou outra atividade biológica, e que atua independentemente do domínio de ligação a carboidrato. As quimerolectinas podem se comportar como merolectinas ou hololectinas, dependendo do número de ligação a carboidratos. Ricina, a lectina da mamona (*Ricinus communis*) (PEUMANS; VAN DAMME, 1998), e a PPL-2, uma lectina isolada de sementes de *Parkia platycephala* (CAVADA *et al.*, 2006), são exemplos de quimerolectinas. As superlectinas são um tipo especial de quimerolectinas, que apresentam dois domínios ligantes a carboidratos, que são estruturalmente diferentes e reconhecem açúcares não relacionados. Segundo Van Damme *et al.* (1996b), a lectina TxLC-I (isolada do bulbo da tulipa), formada por dois domínios de ligação a

carboidratos, que reconhecem manose e N-acetilgalactosamina, respectivamente é um exemplo de lectina pertencente a esse grupo (Figura 1).

Figura 1 - Classificação estrutural das lectinas vegetais. Representação esquemática de merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas.



Fonte: Adaptado de Peumans *et al.*, 2001.

As lectinas apresentam uma diversidade de atividades biológicas, tais como, a capacidade de aglutinar células (SHARON; LIS, 1972), estimular a mitogênese em linfócitos (ASHRAF; KHAN, 2003), induzir a apoptose em células tumorais (BAH *et al.*, 2011), regular a migração e a adesão de células bacterianas (TANNE; NEYROLLES, 2010), além de serem ferramentas muito úteis na investigação de carboidratos na superfície celular, em particular, em estudos sobre mudanças no padrão de glicosilação dessas superfícies, o que pode indicar malignidade destas células (SHARON; LIS, 2004). Estas moléculas têm sido encontradas em quase todos os organismos incluindo animais, como peixes (WANG *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2016), crustáceos (XIU *et al.*, 2015), além de fungos (DAVITASHVILI *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2014); algas (CALVETE *et al.*, 2000) e plantas (CARVALHO *et al.*, 2015; SIRIPIATTHANA *et al.*, 2015). As lectinas vegetais já foram purificadas a partir de folhas (YAGI *et al.*, 2002), frutos (PEUMANS *et al.*, 2000), raízes (WANG; NG, 2006), tubérculos (VAN DAMME *et al.*, 1995), rizomas (JINKU; ZHONGKUI; HONG, 1996), bulbos (VAN

DAMME; ALLEN; PEUMANS, 1987) , cascas (KAKUA; PEUMANS; GOLDSTEIN, 1990; VAN DAMME; VAN LEUVEN; PEUMANS, 1997), caules (ETZLER, 1994) e sementes (KABIR, 1995; MOREIRA *et al.*, 1998; SANTOS *et al.* 2009) de diversas plantas.

De acordo com Van Damme e colaboradores (1998), as lectinas vegetais podem ser classificadas em sete famílias, de acordo com as semelhanças estruturais e evolutivas. Estas famílias foram nomeadas de: lectinas de Amaranthaceae, lectinas do floema de Curcubitaceae, lectinas quitina-ligantes contendo domínio de heveína, lectinas relacionadas à jacalina, lectinas de leguminosas, lectinas de monocotiledônias ligantes a manose e proteínas inativadoras de ribossomos tipo 2.

As lectinas de Amaranthaceae foram encontradas exclusivamente em sementes de espécies do gênero *Amaranthus* (família Amaranthaceae), como por exemplo, *A. caudatus*, *A. spinosus*, *A. leucocarpus* e *A. cruentus*. Estas lectinas apresentam massa molecular de aproximadamente 33 kDa, são não glicosiladas e possuem alta afinidade a N-acetilgalactosamina (VAN DAMME *et al.*, 1998). A família das lectinas do floema de Curcubitaceae é formada por proteínas que ocorrem exclusivamente no exsudado do floema de espécies do gênero Curcubitaceae. As lectinas pertencentes a esta família são não glicosiladas, formadas por duas subunidades idênticas com massa molecular de aproximadamente 25 kDa e alta afinidade a oligômero de N-acetilglicosamina (VAN DAMME *et al.*, 1998). As lectinas quitina-ligante contendo domínio de heveína já foram purificadas de várias espécies de plantas como: seringueira (*Hevea brasiliensis*), amaranto (*Amaranthus caudatus*), sabugueiro (*Sambucus nigra*) e urtiga (*Urtica dioica*). Estas lectinas apresentam um ou mais domínios heveína que apresenta especificidade por trímeros ou tetrâmero de N-acetilglicosamina - GlcNAc (principal unidade monomérica constituinte da quitina). São também exemplos de lectinas que se ligam a quitina as quitinases classe I (COLLINGE *et al.*, 1993; VAN DAMME *et al.*, 1998). A família das lectinas relacionadas à jacalina é formada por proteínas que são estruturalmente similares à jacalina (a lectina das sementes de *Artocarpus integrifoli*). As lectinas pertencentes a esta família são encontradas principalmente em espécies de Moreaceae e Convolvulaceae. Com base na especificidade de ligação, as lectinas desta família podem ser subdivididas em dois subgrupos específicos: i) as que reconhecem galactose, e ii) as que reconhecem manose (VAN DAMME *et al.*, 1998). Dentre as lectinas estruturalmente relacionadas à jacalina e que reconhecem galactose tem-se a frutalina, a lectina da fruta-pão (*Artocarpus incisa*) (MOREIRA *et al.*, 1998).

O maior número de lectinas vegetais já isoladas e estudadas pertence à família das lectinas de leguminosas. As proteínas dessa família são frequentemente formadas por 2 a 4 subunidades de 25 a 30 kDa, com cada subunidade apresentando um sítio de ligação a carboidrato. Estas lectinas são caracterizadas por possuírem uma alta similaridade estrutural, porém, com especificidade por carboidratos e propriedades biológicas distintas (CAVADA *et al.*, 1998; VAN DAMME *et al.*, 1998). A lectina Concanavalina-A (Con-A) é o exemplo mais estudado dessa família (PARKIN; RUPP; HOPE, 1996; PARKIN; CRAIG, 2002). As lectinas de monocotiledôneas, ligantes a manose formam uma superfamília de lectinas encontradas em monocotiledôneas que são estreitamente relacionadas e que apresentam especificidade por manose. Estas lectinas são encontradas em espécies da família Amaryllidaceae, Alliaceae, Orchidaceae, Araceae, Liliaceae e Bromeliaceae (BARRE *et al.*, 1996; VAN DAMME *et al.*, 1998)

As proteínas inativadoras de ribossomos tipo 2 (RIPs Tipo 2) são uma classe de enzimas que inativam ribossomos eucarióticos, inibindo a síntese proteicas. De acordo com Van Damme *et al.*, (1998) as lectinas RIP Tipo 2 que já foram isoladas e caracterizadas pertencem as seguintes famílias: Cucurbitaceae (ex.: *Momordica charantia*), Euphorbiaceae (ex.: *Ricinus communis*, *Croton* sp.), Iridaceae (ex.: *Iris* sp.), Lauraceae (ex.: *Cinnamomum camphora*), Leguminosae (ex.: *Abrus precatorius*), Passifloraceae (ex.: *Adenia* sp.), Ranunculaceae (ex.: *Eranthis hyemalis*), Sambucaceae (*Sambucus* sp.), e Viscaceae (ex.: *Viscum album*). A maioria dessas RIPs Tipo 2 apresentam especificidade por galactose, N-acetilgalactose ou são galactose/N-acetilgalactose específicas. No entanto, algumas apresentam clara preferência por di- ou oligossacarídeos (VAN DAMME *et al.*, 1998).

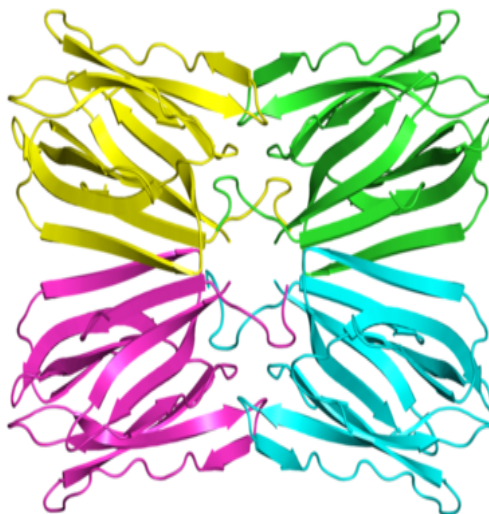
Frutalina (FTL): Lectina das sementes de *Artocarpus incisa* L.

A *A. incisa* é uma planta encontrada em diferentes habitats, como regiões subtropicais e tropicais do mundo, pertencente à família Moraceae, formada por aproximadamente 75 gêneros e 1550 espécies tropicais. No Brasil, podem ser encontrados 28 gêneros com cerca de 340 espécies (BARROSO, 1978). As lectinas foram isoladas e caracterizadas apenas dos gêneros *Artocarpus* e *Maclura*.

No Brasil, são encontradas duas variedades de *A. incisa*: a variedade apyrena, tipo não seminífera (sem sementes) conhecida como “fruta pão de massa”, e a variedade seminífera, conhecida como “fruta pão de caroço”. Estudos realizados por Moreira *et al.* (1998) com a variedade seminífera de *A. incisa*, utilizando a cromatografia de afinidade em matriz de galactomanana de *Adenantha pavonina*, resultaram no isolamento de uma lectina denominada frutalina. Porém, com o objetivo de aumentar a disponibilidade desta lectina para fins biomédicos, Oliveira *et al.* (2008) realizaram a produção desta lectina em um sistema heterólogo de *Pichia pastoris* o qual é conhecido por ser um excelente meio para produção em larga escala de certas moléculas. Oliveira *et al.* (2009b) afirmam que a frutalina pode ser facilmente produzida em sistemas de expressão heterólogos de *Escherichia coli*. Estudos mais recentes descrevem um novo sistema para a produção e purificação desta lectina em *E. coli* (COSTA *et al.* 2014; OLIVEIRA, TEIXEIRA e DOMINGUES, 2014).

Pesquisas sobre os aspectos estruturais da frutalina mostram que esta lectina é uma proteína tetramérica composta por quatro monômeros ligados por ligações não covalentes. Duas de suas subunidades apresentam massa molecular de 15,5 KDa, e duas de 12 KDa. A massa molecular da frutalina é de aproximadamente 48 KDa, dependendo do meio, e a conformação tridimensional predominante é a folha β antiparalela (64%) contendo quatro locais de ligação a D-galactose, podendo assim ser classificada como uma hololectina. Esta lectina apresenta 2,1 % de carboidrato em sua estrutura elevados teores de aminoácidos ácidos e hidroxilados e baixo teor de aminoácidos sulfurados (MOREIRA *et al.*, 1998). Estudos realizados por Pereira *et al.* (2015) levaram a determinação da estrutura cristalográfica da lectina frutalina (Figura 2) e mostraram que esta é expressa em diferentes isoformas, as quais apresentam diferenças principalmente na glicosilação pós-transducional.

Figura 2 - Modelo tetramérico da lectina frutalina mostrando a presença de quatro monômeros.



Fonte: PDB: Cod. 4WOG. (Pereira *et al.*, 2015).

Estudo sobre a atividade biológica da frutalina tem mostrado que esta é capaz de aglutinar eritrócitos humanos e de vários animais, não apresentando especificidade por qualquer antígeno do sistema ABO (MOREIRA *et al.*, 1998). Além disso, foi demonstrado que a frutalina pode exercer papel gastro-protetor contra lesões gástricas induzidas por etanol, sugerindo que a frutalina provavelmente pode ser usada com agente terapêutico para o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento da úlcera gástrica (ABDON *et al.*, 2012)

A ligação da frutalina a receptores na superfície celular desencadeia uma série de respostas biológicas, tais como indução da migração de neutrófilos na cavidade pleural de ratos, indução da quimiotaxia, reorganização dos filamentos de actina do citoesqueleto de neutrófilos humanos (BRANDO-LIMA *et al.*, 2005) e ativação mitogênica de linfócitos humanos (BRANDO-LIMA *et al.*, 2006).

Aplicações das Lectinas no Diagnóstico e Terapia do Câncer

O câncer é um complexo de doenças que envolvem diversas mudanças na fisiologia celular, conduzindo à proliferação descontrolada de células anormais (neoplasia) e à formação de tumores malignos. A invasão de tecidos normais adjacentes e a metástase dessas células são as principais causas de morbidade e de mortalidade para a maioria dos pacientes com câncer (ANAND *et al.*, 2008; BAILAR; GORNIK, 1997). O diagnóstico destas doenças se faz pelo uso

de diversas metodologias, incluindo os exames por imagem (tomografia computadorizada, ultrassonografia, imagem por ressonância magnética, entre outros), biópsia, estudos histopatológicos, citopatológicos e dosagem de marcadores tumorais (INCA, 2016). Além disso, o tratamento baseia-se no uso de cirurgia, quimioterapia e radioterapia, os quais tem melhorado a taxa de sobrevivência dos pacientes. Porém, nenhuma dessas modalidades de tratamento está livre dos efeitos colaterais que podem ser exercidos sobre o paciente (DING; ALLMAN; SALVI, 2012; HIROSE; SIMON; OU, 2011), incluindo mulheres em idade reprodutiva. Já foi demonstrado que drogas anticancerígenas sintéticas causam a morte tanto de células cancerígenas como de células normais, enquanto que os produtos naturais oferecem ação protetora e terapêutica, apresentando baixa citotoxicidade para células normais. Desta forma, em busca de novas drogas que possam ser eficientes contra o câncer, e que exerçam efeito citotóxico mínimo sobre as células normais, diversos fitoquímicos, incluído as lectinas, vêm sendo intensivamente estudados devido sua função na quimioprevenção desta doença (SAWANOBORI *et al.*, 2016).

As lectinas são conhecidas por apresentarem propriedades anticancerígenas *in vitro* e *in vivo*, por se ligarem preferencialmente às membranas das células tumorais ou aos seus receptores, causando citotoxicidade, apoptose e inibição do crescimento das células tumorais (GONZÁLEZ DE MEJÍA;PRISECARU, 2005). Os efeitos que as lectinas podem exercer sobre as células tumorais irão depender da fonte e da concentração destas moléculas, além da linhagem celular ou do tipo de câncer a ser tratado (FERRIZ-MARTINEZ *et al.*, 2010).

Desta forma, diversas lectinas vêm sendo alvo de pesquisas que visam a busca de alternativas para o diagnóstico e tratamento de câncer. As primeiras pesquisas se concentraram em estudos sobre as propriedades citotóxicas das lectinas ricina (*Ricinus communis* L.) e abrina (*Abrus precatorius*) como potenciais terapias para o câncer humano (LIN *et al.*, 1970). Ao mesmo tempo, Shoham *et al.* (1970) estudando as propriedades terapêuticas da Concanavalina A (*Canavalia ensiformis*) mostraram que esta lectina inibiu o crescimento tumoral em hamsters.

Na última década, diversos estudos foram realizados com o objetivo de buscar lectinas que poderão ser utilizadas como alternativa na terapia anti-câncer (Tabela 1). Entre estas lectinas pode-se destacar a frutalina, a lectina da fruta-pão (*Artocarpus incisa*). Estudos realizados por Oliveira *et al.* (2011) demonstraram que a frutalina nativa e recombinante exercem efeito citotóxico irreversível sobre células HeLa por induzir a apoptose e inibir a proliferação celular. Oliveira *et al.* (2009a) ao estudar a expressão de glicoconjugados específicos para a

frutalina nativa e recombinante em tecidos de carcinoma e de hiperplasia benigna da próstata humana, utilizando a técnica de imunohistoquímica, verificaram que ambas as lectinas apresentam considerável potencial para diferenciar alterações neoplásicas de lesões benignas da próstata humana. Porém, apesar desses estudos serem fundamentais no conhecimento dos efeitos que a frutalina pode exercer sobre diferentes tipos de câncer, ainda não se sabe o efeito que esta lectina pode exercer sobre o desenvolvimento das células germinativas femininas.

Tabela 1- Efeito citotóxico e anticancerígeno de algumas lectinas de plantas.

Lectina	Efeitos	Referência
AHL <i>Arisaema helleborifolium</i>	Inibição da proliferação <i>in vitro</i> de algumas linhagens de células de câncer humano, como HOP-62, HCT-15, HEP-2, HT-29, PC-3 e A-549	Kaur <i>et al.</i> , (2006)
VCA <i>Viscum album coloratum</i>	Indução da apoptose de células do câncer do cólon através da ativação da via de sinalização Receptor 1 do fator de necrose tumoral (TNFRI), contribuindo para a ativação das caspases e inibição das proteínas anti-apoptóticas	Khil <i>et al.</i> , (2007)
Frutalina <i>Artocarpus incisa</i>	Diferenciação das alterações neoplásicas de lesões benignas da próstata humana	Liu; Min; Bao (2009) Oliveira <i>et al.</i> , (2009a)
Concanavalina A <i>Canavalia ensiformis</i>	Indução da apoptose das células A375 de melanoma humano, através da via dependente de caspase, bem como através da via apoptótica mitocondrial	
Lectina do rizoma de <i>Curcuma amarissima</i> Roscoe	Efeito citotóxico <i>in vitro</i> contra a linhagem celular BT474 de câncer da mama humano	Kheeree <i>et al.</i> , (2010)
PCL <i>Polygonatum cyrtonema</i>	Inibição do crescimento de várias linhagens de células cancerígenas (por exemplo, HeLa, MCF-7, A375 e células L929)	Wang <i>et al.</i> , (2011)
Frutalina <i>Artocarpus incisa</i>	Indução da apoptose e inibição da proliferação de células HeLa	Oliveira <i>et al.</i> , (2011)
MLL <i>Morus alba</i> L.	Indução da apoptose de células de câncer de mama (MCF-7) e câncer de cólon (HCT-15) humano, através da via dependente de caspase	Deepa e Priya (2012)
Lectina das sementes de <i>Phaseolus vulgaris</i>	Atividade antiproliferativa sobre células de câncer de mama (MCF-7)	Cheung <i>et al.</i> , (2013)
BfL <i>Bauhinia forficata</i>	Indução da morte celular e inibição da adesão celular de células de câncer de mama (MCF-7)	Silva <i>et al.</i> , (2014)
BL <i>Brassica oleracea</i>	Atividade anti-proliferativa em células de carcinoma hepático (Hep G2) e de câncer de mama (MCF-7)	Xu <i>et al.</i> , (2015)
Riproximina <i>Ximenia americana</i>	Atividade antineoplásica em células de câncer de mama	Pervaiz <i>et al.</i> , (2016)
Aglutinina <i>Abrus</i> (AGG) <i>Abrus precatorius</i>	Atividade anti-angiogênica e apoptótica em células de câncer de mama	Bhutia <i>et al.</i> , (2016)
POL <i>Polygonatum odoratum</i>	Indução da apoptose e da autofagia de células de adenocarcinoma (A549)	Wu <i>et al.</i> , (2016)

Efeitos tóxicos dos agentes quimioterápicos sobre os gametas femininos

A qualidade de vida e a preservação da fertilidade são questões que devem ser cuidadosamente discutidas entre mulheres submetidas ao tratamento de câncer em idade reprodutiva (LEE *et al.*, 2006). Embora o tratamento oncológico, mediante a administração de agentes quimioterápicos, venha aumentando a sobrevida dessas pacientes estes mesmos vêm ocasionando alterações não apenas nas células tumorais, mas também nas células normais do organismo, incluindo as células germinativas, e assim, esgotando o *pool* folicular e aumentando o risco de falência ovariana e infertilidade (MEIROW *et al.*, 2010). Segundo Soleimani *et al.* (2011), ainda não existem estudos com humanos que examinem a qualidade dos óocitos e dos embriões após o tratamento quimioterápico. Porém, sabe-se que os agentes quimioterápicos podem causar efeitos gonadotóxicos, interrompendo processos celulares básicos, interferindo na proliferação celular.

Os agentes alquilantes podem criar ligações covalentes entre as cadeias do DNA, interferindo com a separação da dupla hélice do DNA durante o processo de replicação, interrompendo o ciclo celular. Além disso, o tratamento com os agentes alquilantes e a terapia com ciclofosfamida têm causado destruição dos oócitos, depleção folicular, fibrose cortical e danos aos vasos sanguíneos (FLEISCHER; VOLLENHOVEN; WESTON, 2011; MEIROW *et al.*, 2010).

Já os agentes quimioterápicos rotineiramente utilizados no tratamento do câncer de mama são extremamente tóxicos para os ovários, particularmente para os folículos primordiais (GADDUCCI; COSIO; GENAZZANI, 2007). Porém, esses quimioterápicos não exercem efeito citotóxico apenas sobre os folículos primordiais, podendo atuar também sobre os folículos em crescimento (Tabela 2). A presença dos folículos em crescimento inibe o recrutamento dos folículos primordiais, e a perda crescente dessa população folicular leva ao aumento na ativação de folículos primordiais, e assim, a perda da reserva folicular. Dados publicados por Kalich-Philosoph *et al.* (2013) sobre a ação de agentes quimioterápicos, como a ciclofosfamida e cisplatina, sobre a ativação folicular em ratas, sugerem que estas drogas ocasionam a ativação dos folículos primordiais quiescentes, evento que culminou no aumento precoce na quantidade dos folículos em crescimento e, simultaneamente, na morte dos folículos por apoptose, resultando na

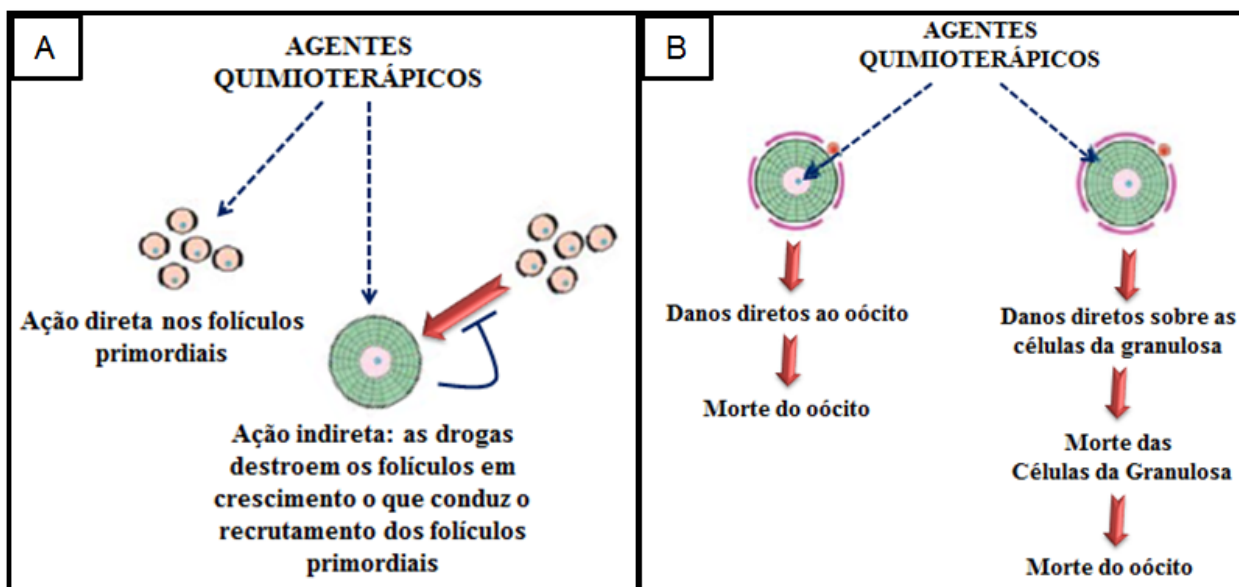
perda da reserva folicular ovariana inicial. Além disso, os quimioterápicos podem atuar diretamente sobre o oócito ou sobre as células da granulosa (Figura 3A). Assim, a morte do oócito pode ocorrer de forma direta, ou resultar da morte das células da granulosa, uma vez que a sobrevivência do oócito depende de fatores secretados pelas células da granulosa (Figura 3B) (MORGAN *et al.*, 2012).

Tabela 2 - Agentes quimioterápicos e seus principais alvos no ovário.

Quimioterápicos	Espécies Modelo	Tipo de Células Afetadas	Classes Foliculares Afetadas	Autores
Doxorrubicina	Camundongos	Células da Granulosa	Secundário	BEN-AHARON <i>et al.</i> (2010)
	Humanos e Camundongos	Oócitos, células da granulosa, estroma e vasos sanguíneos	Primordial e pré-antral	SOLEIMANI <i>et al.</i> (2011)
Cisplatina	Camundongos	Oócitos	Primordial, Primário	GONFLONI <i>et al.</i> (2010)
Irinotecano	Camundongos	Células da Granulosa	Pré-antral, antral, pré-ovulatório	UTSUNOMIYA <i>et al.</i> (2008)
Ciclofosfamida	Camundongos, Ratos	Oócitos	Primordial, primário	PETRILLO <i>et al.</i> (2011)
	Humanos	Oócitos, células da granulosa	Pré-antral	ABIR <i>et al.</i> (2008)
	Humanos	Oócito	Primordial	OKTEM; OKTAY (2007a)
Cisplatina/paclitaxel	Ratos	Células da Granulosa	Primordial	YUCEBILGIN <i>et al.</i> (2004)
	Humanos			SANCHEZ <i>et al.</i> (2013)

Fonte: Adaptado de Morgan *et al.*, (2012).

Figura 3 - Os alvos dos agentes quimioterápicos no tecido ovariano.



(A) Os agentes quimioterápicos podem atingir diretamente o *pool* de folículos primordiais ou a população dos folículos em crescimento. (B) Os agentes quimioterápicos podem ser orientados diretamente para o oócito ou para as células da granulosa. A morte do oócito seria o resultado da morte das células da granulosa, uma vez que o oócito depende das células da granulosa para sua sobrevivência. **Fonte:** Adaptado de Morgan *et al.*, (2012).

O efeito que a quimioterapia pode exercer sobre a função ovariana pode ser imediato ou tardio. O efeito imediato ocorre durante o tratamento, é temporário, resulta da perda de folículos em crescimento e induz à amenorreia. Porém, desde que suficientes folículos primordiais permaneçam quiescentes, sobre a interrupção do tratamento, poderão reestabelecer a população de folículos em crescimento. Em contraste, a insuficiência ovariana tardia é resultado da perda do *pool* de folículos primordiais e resulta em falência ovariana prematura (FOP), conduzindo à infertilidade (MORGAN *et al.*, 2012). Desta forma, o desenvolvimento de terapias que possibilitem uma maior sobrevida, bem como que resultem em menores efeitos sobre a fertilidade feminina é de extrema relevância e interesse para a clínica médica.

Oogênese, foliculogênese e ativação folicular

A principal função do ovário é a ovulação. O processo de ovulação precede a foliculogênese, sendo intensamente controlado por hormônios esteroides ovarianos (FINDLAY *et al.*, 2001) e fatores de crescimento (SKINNER, 2005). A foliculogênese e a ovulação estão

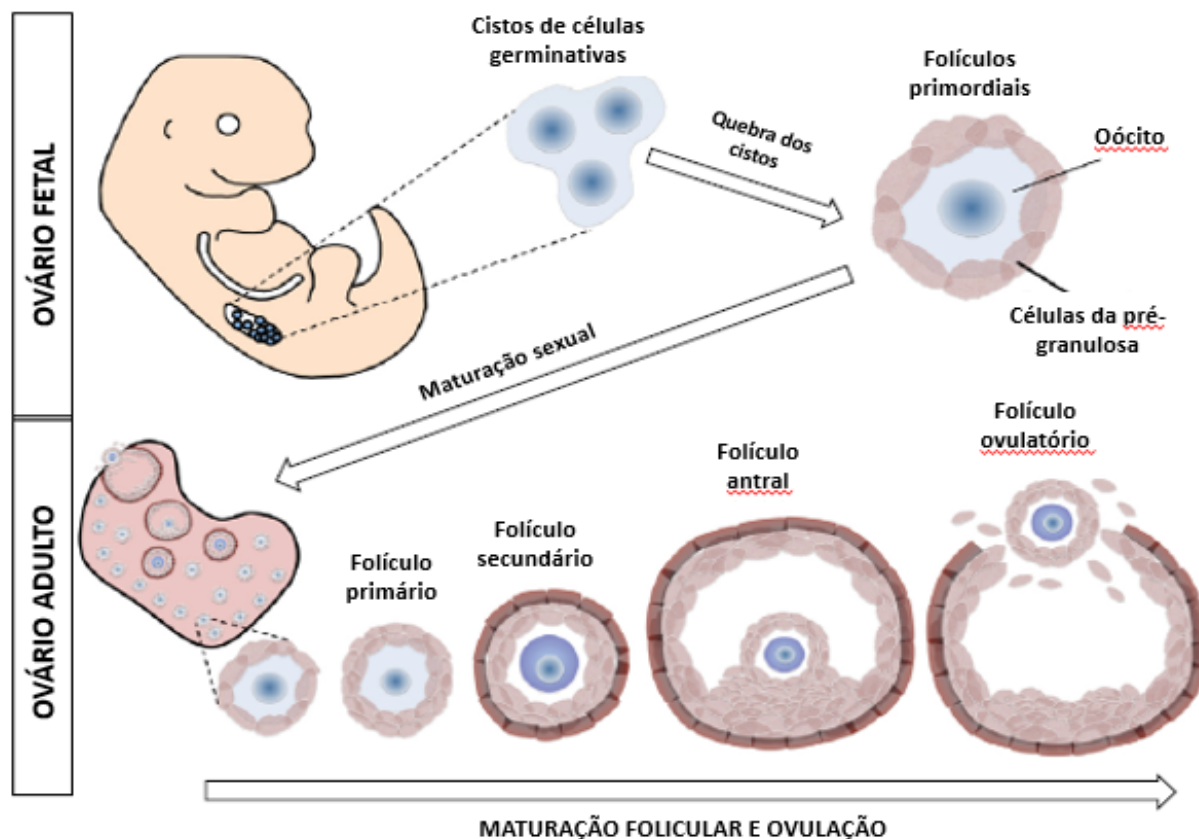
intimamente ligados à comunicação multidirecional entre o oócito, células da granulosa e células da teca (UZUMCU; ZACHOW, 2007). A formação de folículos ovarianos inicia-se, no ovário fetal, por volta da 12^a a 16^a semanas de gestação.

As gônadas indiferenciadas surgem como um espessamento do epitélio celômico na superfície ventrolateral de cada mesonéfron. As células germinativas primordiais (CGPs) migram do saco vitelino através de diferentes tecidos para colonizar as gônadas primitivas (ou sulcos genitais) (EDDY *et al.*, 1981; GUIGON; MAGRE, 2006). A proliferação das células germinativas e células somáticas leva a um rápido alargamento das cristas genitais. Uma vez estabelecidas no ovário fetal, as CGPs mudam sua forma, diminuem sua motilidade e continuam sua proliferação, até que se diferenciam em oogônias (CHASSOT *et al.*, 2011).

No ovário em desenvolvimento, as células germinativas (ou oogônias) e as células epiteliais (pré-granulosa) organizam-se progressivamente em estruturas epiteliais, e assim, os oócitos de mamíferos se desenvolvem a partir dessas oogônias, que se formaram a partir das CGPs. Na última replicação do DNA, antes de entrar na primeira divisão meiótica (PICTON; BRIGGS; GOSDEN, 1998), as oogônias aumentam de tamanho e se diferenciam em oócitos primários imaturos, que sofrem uma parada no seu desenvolvimento (SUH *et al.*, 2006), em prófase I no estágio de diplóteno ou vesícula germinativa (VG) Neste momento é caracterizado o início da foliculogênese com a formação do folículo primordial.

A foliculogênese inicia-se com a formação do folículo primordial e culmina com o estágio de folículo de Graaf ou pré-ovulatório (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005) (Figura 4). No início da foliculogênese há o recrutamento de células da pré-granulosa pelo oócito para formar os folículos primordiais no ovário fetal ou neonatal (PICTON; BRIGGS; GOSDEN, 1998). Os folículos primordiais aparecem no ovário fetal por volta de 90 dias em vacas (RÜSSE, 1983); aos 75 dias em ovelhas (MCNATTY *et al.*, 1995; SAWYER *et al.*, 2002) e em humanos entre o sexto (180 dias) e o nono (270 dias) mês de gestação (ERICKSON; WILLIAMS, 2008). Nesta fase, o oócito está na prófase I da meiose e só retoma a meiose ou quebra da vesícula germinativa com a ovulação (MCLAUGHLIN; MCIVER, 2009; PICTON; BRIGGS; GOSDEN, 1998). O primeiro tipo de célula somática que interage com as células germinativas são as células da granulosa ou células precursoras da granulosa (PEPLING; SPRADLING, 2001). A natureza desta interação é bidirecional, estabelecida no momento da formação do folículo e permanece ativa durante toda a vida do folículo (Figura 4) (MATZUK *et al.*, 2002).

Figura 4 - Caracterização morfológica da foliculogênese, desde a formação do folículo primordial ao estágio ovulatório.

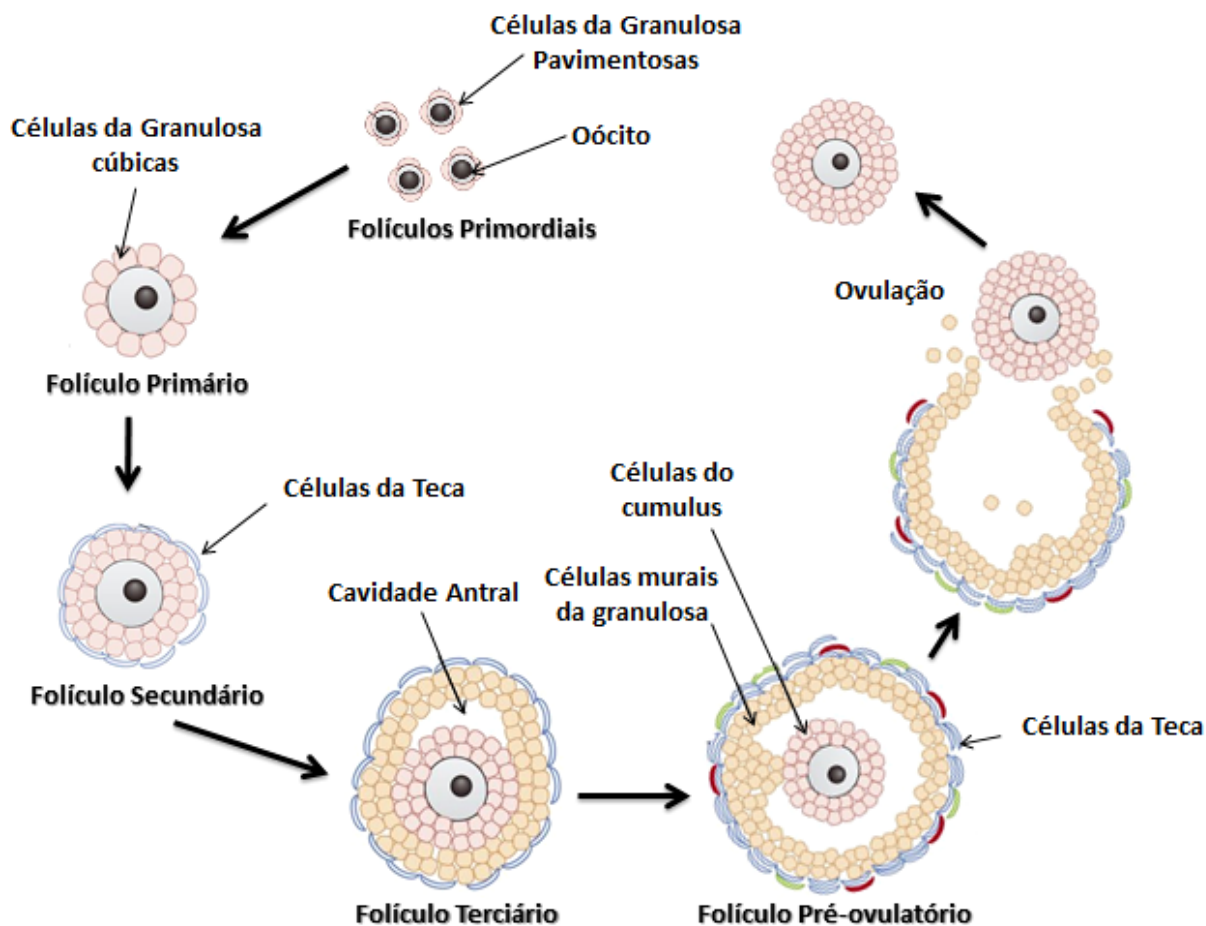


Fonte: Adaptado de Grive; Freiman, 2015.

Os folículos ovarianos podem ser classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento em pré-antrais (primordiais, de transição, primários e secundários) ou em folículos antrais (terciários e pré-ovulatórios) (Figura 5). Os folículos primordiais consistem em um oócito primário envolvido por uma única camada de células foliculares pavimentosas. Já os folículos primários apresentam uma camada de células da granulosa de forma cuboidal, os folículos secundários apresentam duas a quatro camadas de células da granulosa e folículos pré-antrais grandes apresentam de quatro a seis camadas de células da granulosa. Os folículos antrais têm mais de cinco camadas de células da granulosa e uma cavidade repleta de fluido folicular, o antro (GOUGEON, 1986; HIRSHFIELD, 1994). A segunda população de células somáticas, as células da teca, são recrutadas durante as últimas etapas da foliculogênese. As células da granulosa e células da teca começam a interagir durante as fases iniciais da foliculogênese através

da sinalização célula a célula, que é mediada principalmente por fatores parácrinos locais e mecanismos justácrinos (SKINNER, 2005).

Figura 5 - Classificação, organização e estrutura dos folículos ovarianos. Notar a sequência evolutiva desde os folículos primordiais até a formação da cavidade antral e ovulação.



Fonte: Adaptado de Georges *et al.*, 2014.

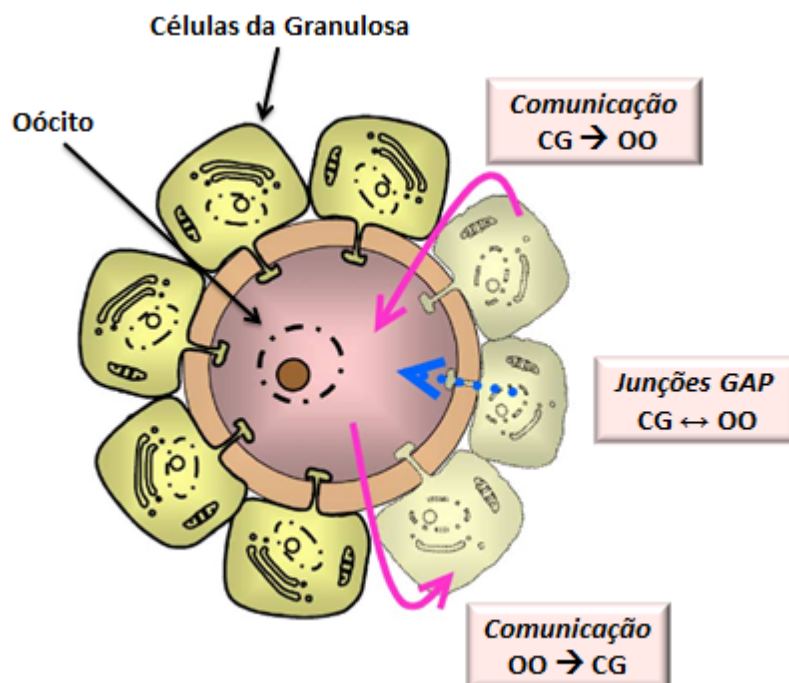
O desenvolvimento de folículos primários para pré-antrais tardios/antral inicial envolve uma série de modificações como o crescimento do oócito, formação da zona pelúcida, proliferação das células da granulosa formando múltiplas camadas, formação de uma lâmina basal, condensação das células do estroma em torno da lâmina basal para formar uma camada de células da teca, e o desenvolvimento de espaços cheios de líquido que gradualmente coalescem para formar uma única cavidade antral (MCGEE; HSUEH, 2000).

A foliculogênese em mamíferos pode ser dividida em dois períodos distintos: gonadotrofina-independente (foliculogênese pré-antral) e dependente de gonadotrofinas (antral

ou de Graaf). Respondendo à secreção de gonadotrofina pituitária cíclica, os diversos compartimentos foliculares interagem de uma maneira altamente integrada para secretar esteróides sexuais e produzir um oócito fertilizável (ELVIN *et al.*, 2000; LIN *et al.*, 2003). O desenvolvimento dos folículos ovarianos exige uma série de eventos coordenados que induzem alterações morfológicas e funcionais no folículo, levando a diferenciação celular e ao desenvolvimento do oócito. Os processos de recrutamento e seleção dos folículos são coordenados por regulação endócrina e parácrina, resultando no desenvolvimento de um número de folículos ovulatórios que são espécie e raça dependentes (HUNTER *et al.*, 2004).

O desenvolvimento folicular também é regulado por interações extra e intra-ovarianas. As gonadotrofinas da hipófise, hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo-estimulante (FSH), fornecem os principais mecanismos de controle da seleção e dominância via *feedback* com a unidade hipotálamo-hipófise (HUNTER *et al.*, 2004). No ovário, interações celulares entre as células da granulosa, células da teca e oócitos, são essenciais para controlar a diferenciação e a proliferação das células foliculares, permitindo o crescimento do oócito e diferenciação final. As interações entre as células da granulosa e da teca são necessárias para a biossíntese de estrogênio (BONNET *et al.*, 2013). Sob a influência de LH e FSH, respectivamente, as células da teca produzem androgênios que são usados pelas células da granulosa para sintetizar estrogênios, que, por sua vez protegem o folículo dominante da atresia. A comunicação entre as células da granulosa e o oócito é essencial para a foliculogênese, o crescimento e maturação oocitária. A comunicação entre estas células ocorre por sinalização parácrina e junções *gap*, assim, o oócito secreta fatores parácrinos solúveis que agem nas células da granulosa, que por sua vez, regulam o desenvolvimento de oócitos num eixo de comunicação bi-direcional (Figura 6). Esta comunicação é essencial para o crescimento e desenvolvimento tanto do oócito como do folículo (GILCHRIST; RITTER; ARMSTRONG, 2004).

Figura 6 - Comunicação entre o oócito (OO) e as células da granulosa (CG) através da sinalização parácrina (setas curvas) e por junções comunicantes (junções- *gap*) (seta reta pontilhada).



Fonte: Adaptado de Gilchrist; Ritter; Armstrong (2004).

Métodos de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais (FOPAs)

O cultivo *in vitro* de FOPAs é uma técnica importante uma vez tem por objetivo permitir o desenvolvimento folicular, assegurando o crescimento e a maturação dos oócitos, assim como, a multiplicação e diferenciação das células da granulosa *in vitro*. Além disso, através dessa técnica, é possível aperfeiçoar o conhecimento básico sobre os mecanismos envolvidos na foliculogênese ovariana (ARUNAKUMARI; SHANMUGASUNDARAM; RAO, 2010; FIGUEIREDO; RODRIGUES; AMORIM, 2001; SÁNCHEZ et al., 2009), e avaliar a influência de diversos compostos sobre o crescimento e desenvolvimento folicular (CELESTINO *et al.*, 2011; FROTA *et al.*, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2015).

Diversos sistemas de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais têm sido desenvolvidos. Nesses sistemas de cultivo, os folículos ovarianos podem ser cultivados inclusos no próprio tecido ovariano (cultivo *in situ*) ou de forma isolada (cultivo isolado) (ROSSETTO *et al.*, 2011). Além disso, Telfer e colaboradores (2008) demonstraram em seus estudos que o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos

pode ser realizado associando esses dois sistemas de cultivo, em que primeiro é realizado o cultivo *in situ*, e em seguida o cultivo dos folículos isolados crescidos *in vitro*. No caso de animais que apresentam ovários com pequenas dimensões, como no caso dos roedores, é realizado o cultivo do ovário inteiro (FORTUNE, 2003).

Atualmente o cultivo de pequenos fragmentos de córtex ovariano (Figura 7), rico em folículos primordiais vem sendo utilizado com o objetivo de estudar a ativação folicular e o crescimento de folículos primários em diversas espécies (bufalos: ABDEL-GHANI; EL-SHERRY; ABDELHAFEEZ, 2016; cães: ACKERMANN *et al.*, 2016; humanos: ZHAI *et al.*, 2016; ratos: KIM *et al.*, 2016; bovinos: JIMENEZ *et al.*, 2016; ovinos: BANDEIRA *et al.*, 2015; caprinos: RIBEIRO *et al.*, 2015). Entre as vantagens de se realizar o cultivo de pequenos fragmentos de córtex ovariano, pode-se enfatizar: a manutenção do contato celular (ABIR *et al.*, 2006); facilidade da perfusão do meio para o tecido ovariano (TELFER, 1996); e manutenção da integridade tridimensional dos folículos, fornecendo um complexo sistema de suporte que se assemelha ao ovário *in vivo* (PICTON *et al.*, 2008). Entretanto, neste tipo de modelo, observa-se que a grande maioria dos folículos progride para o estágio de folículo primário, mantendo-se viável por até 20 dias (WANDJI *et al.*, 1997), ao passo que poucos progridem para o estágio de folículo secundário.

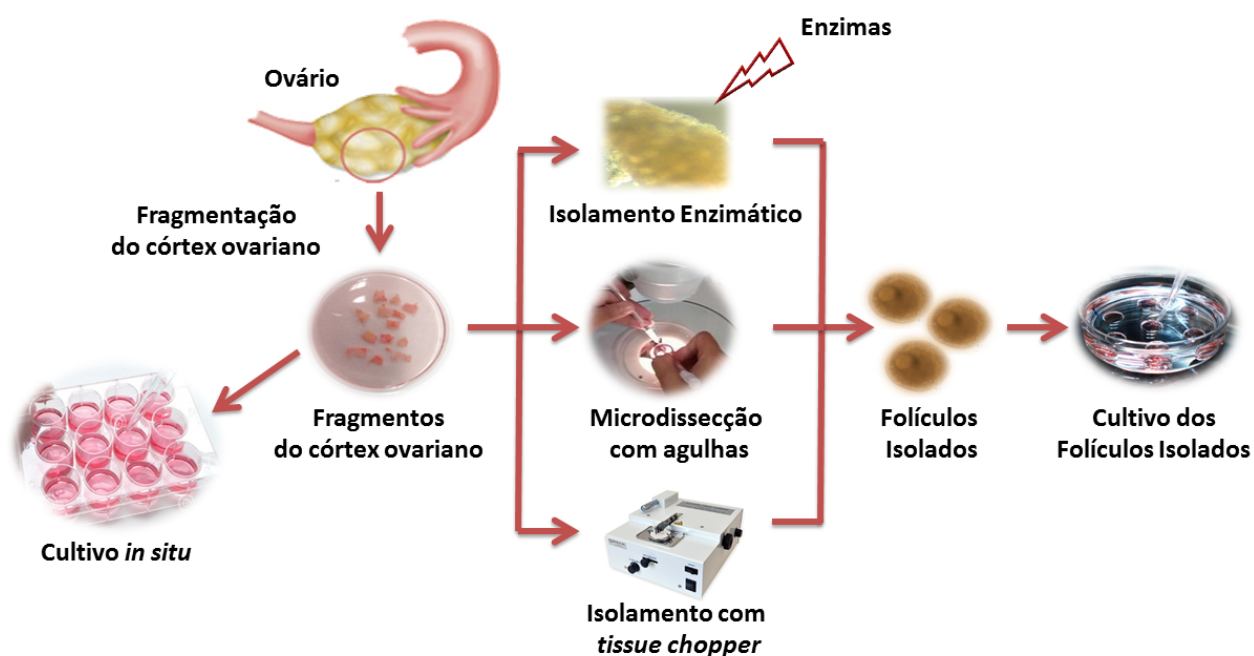
Além do cultivo de folículos *in situ*, pode-se realizar ainda o cultivo de folículos isolados (Figura 7) a partir do tecido ovariano. Para isso, enzimas, tais como a colagenase, pronase, tripsina e DNase, podem ser utilizadas no isolamento de folículos pré-antrais a partir do tecido ovariano (isolamento enzimático), permitindo a recuperação de um grande número de folículos. Porém, principalmente quando a concentração enzimática e o tempo de incubação não são rigorosamente controlados, as enzimas podem danificar a membrana basal ou células da teca (DEMEESTERE *et al.*, 2005; PARK *et al.*, 2005)

A fim de contornar os problemas inerentes à utilização do processo enzimático, métodos mecânicos tais como, a técnica de microdissecação, com o uso de agulhas, e a dissociação mecânica com o *tissue chopper* têm sido utilizados para o isolamento de FOPAs a partir do tecido ovariano (Figura 7) (FIGUEIREDO *et al.*, 2008). Após o isolamento (mecânico e/ou enzimático), os folículos podem ser cultivados preservando sua morfologia para o estudo dos efeitos *in vitro* de diferentes substâncias, como hormônios e fatores de crescimento (SILVA, 2005). Segundo Abir *et al.* (2006) o cultivo de folículos isolados permite o acompanhamento individual dos folículos durante o cultivo, além de possibilitar uma maior perfusão do meio para o folículo. Além disso, esse sistema de cultivo permite um estudo comparativo das melhores condições de cultivo, uma vez que é possível comparar

grupos com um mesmo número de folículos em um determinado estágio de desenvolvimento (SMITZ e CORTVRINDT, 2002).

Recentemente, a microdissecção (método que utiliza agulhas dissecantes) tem se tornado uma das técnicas mais adotadas para isolar folículos pré-antrais de várias espécies (caprinos: GHA et al., 2016; primatas: XU; HENNEBOLD; SEIFER, 2016; roedores: HARDY et al., 2016; e caninos: SERAFIM et al., 2015)

Figura 7. Métodos de Isolamento e de Cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais.



Atresia folicular

Segundo Matsuda *et al.* (2012), o desenvolvimento folicular ovariano é um processo regulado por vários fatores endócrinos, parácrinos, autócrinos e justácrinos que atuam coordenadamente para selecionar folículos para a ovulação. Durante a vida reprodutiva feminina, apenas alguns folículos (<1%) serão ovulados, sendo o destino de folículos durante o crescimento folicular determinado pelo equilíbrio entre muitos processos (diferenciação, proliferação/atresia) (BONNET *et al.*, 2008).

Na fisiologia reprodutiva, a atresia folicular é um fenômeno fundamental através do qual o ovário elimina folículos que não irão ser ovulados. Este fenômeno é aparentemente iniciado por apoptose das células da granulosa, seguido por degeneração do oócito nas últimas

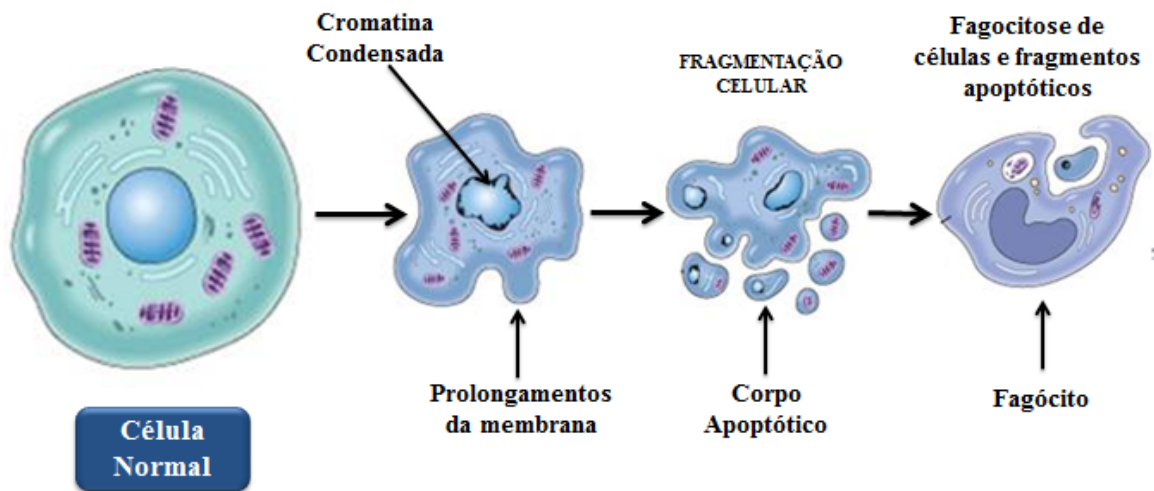
fases da atresia (ALONSO-POZOS *et al.*, 2003; MANABE *et al.*, 1996). Em folículos antrais bovinos, o processo de atresia é iniciado com a morte das células da granulosa por apoptose, levando eventualmente à destruição total da camada de células da granulosa que reveste a parede interna do folículo (JOLLY *et al.*, 1994; IRVING-RODGERS *et al.*, 2001). As células da granulosa presentes nas camadas médias da membrana granulosa sofrem apoptose, enquanto que as células da granulosa em contato com o antro folicular morrem por uma via alternativa, como resultado de diferenciação terminal (VAN WEZEL *et al.*, 1999). A apoptose pode ser iniciada em pelo menos quatro diferentes compartimentos celulares do folículo antral: células da teca, células da granulosa, células do cúmulus e o oócito. Os primeiros sinais "clássicos" da atresia em folículos antrais são a degeneração das células da granulosa mural, que perdem a atividade da aromatase e sofrem apoptose (IRVING-RODGERS *et al.*, 2001). Posteriormente, as células da teca sofrem hipertrofia e diminui a sua produção de androsterona (DRIANCOURT *et al.*, 1998). As células do cúmulus e o oócito são afetados apenas nos estágios mais avançados de atresia folicular (KRUIP e DIELEMAN, 1982; HUSSEIN *et al.*, 2005).

Apoptose

Apoptose é um tipo de morte celular, descrita primeiramente por Kerr, Wyllie e Currie (1972), a qual é caracterizada por um conjunto distinto de alterações morfológicas e bioquímicas, sendo essencial para a regulação do crescimento, desenvolvimento, manutenção da quantidade de células e da homeostase do tecido em organismos multicelulares (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972; JACOBSON; WEIL; RAFF, 1997). Apoptose pode ser reconhecida por características morfológicas muito marcantes e coordenadas, tais como, diminuição do volume citoplasmático, ocasionando retração da célula, o que causa a perda da sua aderência com a matriz extracelular e células vizinhas; condensação da cromatina, que se concentra na periferia da membrana nuclear, que se mantém intacta; manutenção da morfologia das organelas celulares, com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana plasmática; fragmentação internucleossômica do DNA; desintegração do núcleo em fragmentos envoltos pela membrana nuclear; e alterações na superfície celular, tal como a formação de prolongamentos (*blebs*) que aumentam em número e tamanho e se rompem formando os corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos são estruturas que consistem de citoplasma com organelas

hermeticamente acondicionadas, com ou sem um fragmento nuclear, que serão posteriormente fagocitado por macrófagos, células do parênquima, ou células neoplásicas, e degradados dentro de fagolisossomos (Figura 8). Desta forma, a célula é eliminada rapidamente, de maneira a não dar tempo de o seu conteúdo extravasar, causando uma reação inflamatória que poderia assemelhar-se à necrose tecidual (SARASTE, 1999; ENRIGHT; HEBBEL; NATH, 1994; ELMORE, 2007).

Figura 8 - Representação esquemática das características morfológicas da morte celular por apoptose.



Fonte: Adaptado de Kumar *et al.*, 2008.

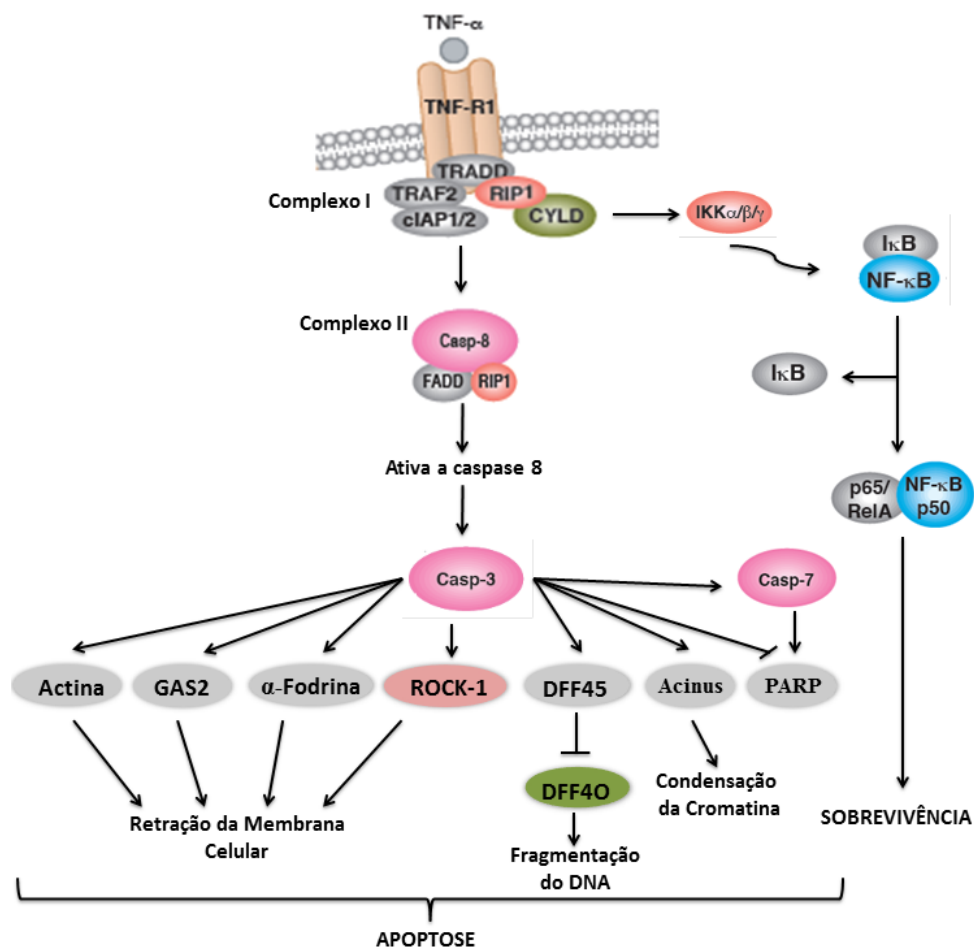
O processo de morte celular é normalmente uma resposta ao microambiente celular, em que a ausência de determinados fatores, como por exemplo, fatores de crescimento e nutrientes, ou a presença de fatores letais, como agentes quimioterápicos, radiação ionizante, níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio, além da ligação de moléculas a receptores de membrana, podem induzir a célula a morte fisiológica ou programada (apoptose) (HENGARTNER, 2000; RADOVIĆ; CUCIĆ; ALTARAC, 2008).

A apoptose pode ser regulada por duas vias: i) via extrínseca ou de receptor de morte e ii) via intrínseca ou via mitocondrial (JIN; EL-DEIRY, 2005). A via extrínseca da apoptose é ativada por receptores de morte ativados por seus ligantes, incluindo principalmente TNF-TNFR1, FasL-Fas e TRAIL-DR4 ou -DR5. Os receptores de morte são proteínas transmembranárias pertencentes a superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (TNF), caracterizados por apresentarem um domínio extracelular de ligação ao ligante, um domínio

transmembranário único e um domínio de morte intracelular, que permite aos receptores iniciarem seus sinais citotóxicos quando ativados por ligantes na superfície celular, ativando a apoptose (GUICCIARDI; GORES, 2009)

A sinalização extrínseca da apoptose pela via TNF pode ser iniciada quando o TNF- α se liga a seu receptor tipo I (TNFRI) na membrana plasmática. Esta ligação induz mudança conformacional no domínio de morte do receptor levando ao recrutamento de algumas proteínas adaptadoras como TRADD, RIP1 e TRAF2, formando um complexo de morte no interior da célula (complexo I). Subsequentemente, TNFRI, TRADD e RIP1 se modificam e se dissociam do TNFRI. O domínio de morte (DD) de TRADD (e/ou RIP1) liga-se a FADD, resultando no recrutamento e ativação das caspases iniciadoras 8/ 10, formando o complexo de sinalização indutor da morte – DISC (complexo II). Uma vez ativada a caspase 8 ou 10 poderá ativar diretamente as caspases executoras, como a caspase-3 e 6, que irão atuar em diversos substratos, tanto no citoplasma como no núcleo, resultando na apoptose. A interação do TNF com seu receptor tipo I (TNFRI), também pode ativar a via NF-kB que induz a expressão de genes pró-sobrevivência, como o Bcl-2 e FLIP, induzindo a sobrevivência celular (Figura 9). (HERREWEGHE *et al.*, 2010; MICHEAU; TSCHOPP, 2003).

Figura 9 - Via extrínseca da apoptose mediada pelo receptor tipo I do TNF (TNFR1).

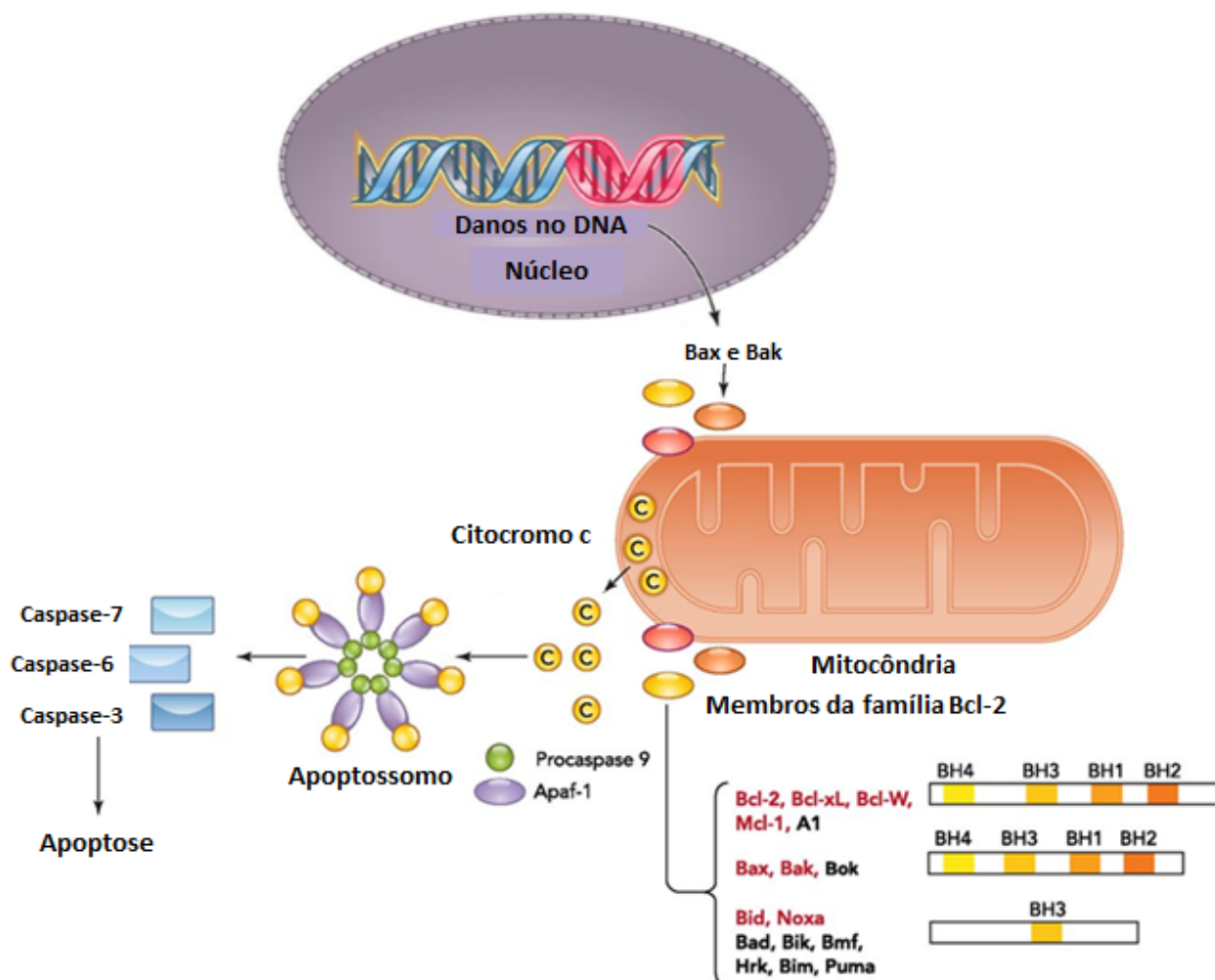


Fonte: Adaptado de Cell Signaling Technology, (2014). Símbolos: cIAP1/2 – Proteínas 1 e 2 inibidoras da apoptose celular; CYLD – Supressor de Tumor deubiquitinase; DFF40 – Fator de Fragmentação do DNA – subunidade 40; DFF45 – Fator de Fragmentação do DNA – subunidade 45; FADD – Domínio de Morte Associado ao FAS; GAS2 – Proteína 2 específica de interrupção do crescimento; IKK $\alpha/\beta/\gamma$ – Inibidor do fator nuclear kappa B quinase subunidades $\alpha/\beta/\gamma$; I κ B – Inibidor de kappa Beta; NF- κ B – Fator Nuclear *kappa* B; NF- κ B p50 - Fator Nuclear *kappa* B p50; p65/RelA – subunidade do NF-Kb; PARP – Poli polimerase (ADP-ribose); RIP1 – Proteína de interação com o receptor-1; ROCK-1 – Proteína quinase 1 contendo *coiled-coil* associado a Rho; TNF-R1 – Receptor 1 de fator de necrose tumoral; TNF- α – Fator de Necrose tumoral α ; TRADD - Proteína com domínio de morte associada ao TNFR1; TRAF2 – Fator 2 Associado a Receptor de TNF.

A via intrínseca da apoptose, ou via mitocondrial (Figura 10), é ativada por vários estímulos, como, radiação, drogas, toxinas, hipertemia, infecções virais, radicais livres, ausência de fatores de crescimento, hormônios e citocinas. A principal classe de reguladores intracelulares de apoptose é formada por proteínas pró- e anti-apoptóticas pertencentes a família Bcl-2, tais como, Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xL, Mcl-1, A1, Bak e Bax. Quando um estímulo apoptótico, como por exemplo, danos no DNA, ativa as proteínas pró- apoptóticas Bak e Bax, e estas podem alterar a permeabilidade da membrana mitocondrial externa, levando à liberação para o citosol de fatores

apoptogênicos incluindo o citocromo c. Quando no citosol, o citocromo c forma um complexo com o fator de ativação associado à apoptose (APAF-1) e a pró-caspase-9, o chamado apoptossomo, que promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando a caspase-9, ativa. Uma vez ativada, a caspase-9 ativa a caspase-3 que irá ocasionar a morte celular por apoptose (CHEN; WANG, 2002; KALIMUTHU; SE-KWON, 2013; WILLIS *et al.*, 2007; YOULE, 2007).

Figura 10 - Via intrínseca (mitocondrial) da apoptose.

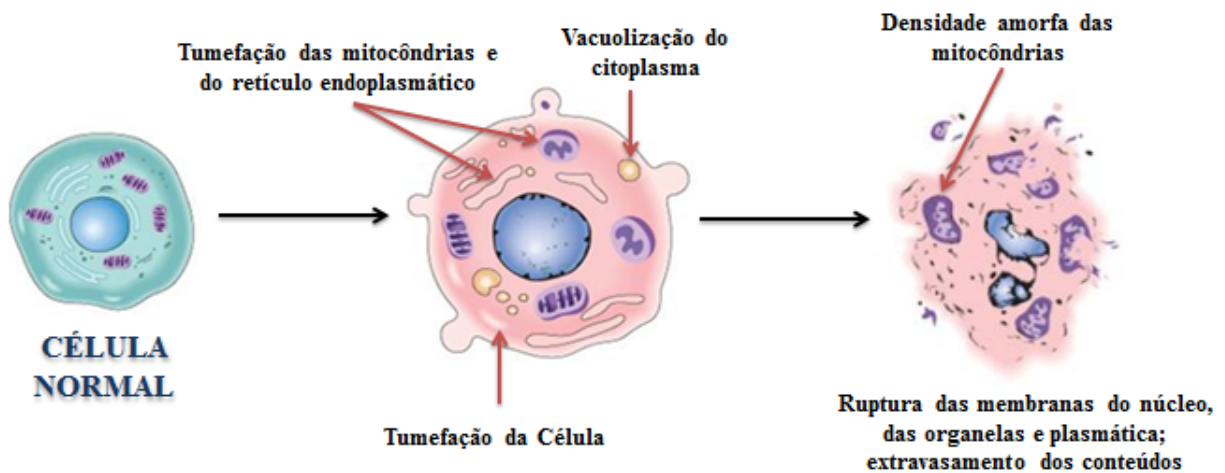


Fonte: Adaptado de Sendoel e Hengartner (2014). A via intrínseca da apoptose ocorre em resposta a sinais fisiológicos ou estresse celular, tais como danos ao DNA. Após a ativação da via, o equilíbrio entre os membros anti- e pró-apoptóticos da família Bcl-2 e as alterações na membrana mitocondrial resultam na permeabilização da membrana e liberação do citocromo c. O citocromo c liga-se ao fator de ativação de protease associada à apoptose 1 (APAF-1) e recruta a pro-caspase-9 para formar o apoptossomo. A caspase-9 é ativada no apoptossomo e promove a ativação de outras caspases adjacentes.

Necrose

A necrose refere-se a um conjunto de alterações morfológicas que surgem nas células após a sua morte, sendo o resultado da ação progressiva de enzimas sobre as células letalmente lesadas. Este tipo de morte celular ocorre geralmente em resposta ao estresse físico-químico, incluindo hipóxia, isquemia, hipoglicemia, mudanças extremas de temperatura e privação de nutrientes (VANLANGENAKKER *et al.*, 2008). Morfológicamente, a necrose pode ser caracterizada por tumefação celular e mitocondrial, vacuolização do citoplasma, ruptura da membrana plasmática ocasionando a liberação de conteúdos celulares e moléculas pró-inflamatórias, induzindo a reação inflamatória em torno da célula (Figura 11). As células que morrem por necrose frequentemente exibem alterações na morfologia nuclear, mas não a condensação da cromatina e fragmentação organizada do DNA em fragmentos de 200 pb, o que é característico da morte celular por apoptose (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972; EDINGER; THOMPSON, 2004; MAJNO; JORIS, 1995).

Figura 11 - Representação esquemática das características morfológicas da morte celular por necrose.



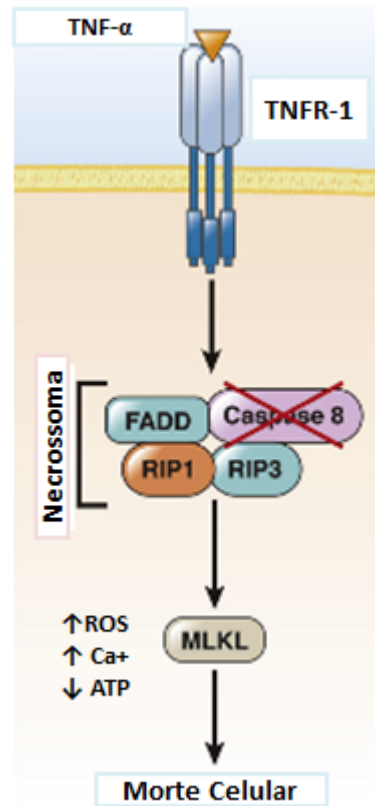
Fonte: Adaptado de Kumar *et al.*, 2008.

Segundo Abbas *et al.*, (2010), alguns mecanismos bioquímicos, tais como depleção de ATP, danos mitocondriais, influxo e perda da homeostasia do cálcio, acúmulo de radicais livres derivados do oxigênio (estresse oxidativo), defeitos na permeabilidade da membrana e

danos ao DNA e às proteínas, podem ser ativados por vários mediadores extracelulares, ligantes e receptores, contribuindo para a lesão celular via necrose.

Por muito tempo, a morte celular por necrose foi considerada um mecanismo de morte celular acidental. Porém já se sabe que a necrose pode ocorrer de maneira regulada, através de um mecanismo conhecido como necroptose (FULDA, 2013). Este termo tem sido usado para designar um determinado tipo de necrose programada que depende da atividade da Proteína Serina-Treonina Quinase de Interação com RIP1. O RIP1 tem mostrado um papel essencial na promoção da necrose em resposta a $TNF\alpha$, TRAIL, ou FasL. Em resposta à sinalização do fator de necrose tumoral α ($TNF-\alpha$) e na ausência da caspase 8 ativa, a RIP1 interage com a serina-treonina quinase de interação com receptor 3 (RIP3), que sofrem fosforilação formando um complexo molecular chamado de necrossoma. O necrossoma, por sua vez, estimula múltiplos sinais pró-necróticos, tais como: permeabilização da membrana lisossomal e liberação citosólica de hidrolases lisossomais, ativação de esfingomielinases (SMases) e alterações metabólicas nas mitocôndrias, resultando na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) que danificarão diretamente macromoléculas, incluindo o DNA, proteínas, lípidos, e promoverão o decréscimo abrupto dos níveis de ATP (Figura 12) (GALLUZZI *et al.*, 2011; MCCALL, 2010; NIKOLETOPOULOU *et al.*, 2013; VANDENABEELE *et al.*, 2010).

Figura 12 - Resumo esquemático da necroptose mediada pelo fator de necrose tumoral α (TNF α).



Fonte: Adaptado de Hirsova; Gores (2015). A necroptose é iniciada por receptores de morte (por exemplo, TNFR-1) em células onde a função da caspase 8 é inibida. Sob estas condições, a ativação do receptor por seu ligante (TNF- α) promove a formação de um necrossoma, um complexo de sinalização formado por FADD, RIP1, e RIP3. Este complexo induz a morte celular por meio de proteínas de domínio quinase de linhagem mista (MLKL), e provavelmente outros mediadores.

3 JUSTIFICATIVA

Os produtos de origem vegetal vêm sendo, há muito tempo, utilizadas pela população mundial como matéria-prima para o tratamento informal, cura e prevenção de seus males. A popularidade alcançada pelo tratamento de doenças mediante o uso de plantas, entretanto, aumentou a preocupação dos pesquisadores em relação à eficácia dos tratamentos fitoterápicos e aos reais efeitos sobre o organismo (MENGUE *et al.*, 2001). Toda substância, mesmo sendo de origem natural, pode ser considerada um agente tóxico, dependendo das condições de exposição, como dose administrada ou absorvida, tempo e frequência de exposição e vias de administração (BARROS; DAVINO, 1996). Dessa forma, é evidente a importância da avaliação do potencial tóxico de compostos derivados de plantas.

Pesquisas a respeito da citotoxicidade da frutalina, sobre linhagens de células cancerígenas têm mostrado que esta lectina apresenta potencial de ser utilizada como quimioterápico no tratamento e diagnóstico de câncer (OLIVEIRA *et al.*, 2009a; OLIVEIRA *et al.*, 2011). Porém, é necessário realizar estudos sobre a ação desta lectina sobre outras células, como os folículos ovarianos, uma vez que este composto, assim como outras dogras anticâncer, pode destruir além das células cancerígenas as células saudáveis, incluído os oócitos, promovendo a esterilidade em mulheres submetidas a tratamento contra câncer. Além disso, é importante saber se esta lectina afeta a sobrevivência dos folículos ovarianos e/ou ocasiona mudanças no processo de ativação e desenvolvimento folicular ovariano, uma vez que estes danos podem levar a depleção do *pool* de folículos primordiais, afetando a fertilidade feminina.

Dentre os critérios de segurança necessários para o uso de fitoterápicos estão os estudos sobre a toxicidade reprodutiva, que incluem uma avaliação das ações sobre a fertilidade e a performance reprodutiva para os produtos administrados durante a gametogênese e fecundação; elucidação dos efeitos adversos sobre os fetos durante a vida intra e extra-uterina para os produtos administrados durante a gestação; e determinação dos efeitos adversos sobre a mãe, o parto e o desenvolvimento pós-natal para os produtos administradas neste período (BRASIL, 1996). Vários métodos *in vitro* para avaliar a toxicidade de substâncias foram padronizados utilizando-se cultivos celulares. Atualmente, um dos debates éticos em ampla evidência está relacionado ao uso de animais em experimentos laboratoriais. Assim, uma das soluções para essa problemática sugere a realização de ensaios de toxicidade *in vitro*, fortemente recomendados para a realização da fase preliminar de testes, com intuito de predizer o potencial tóxico de uma

substância utilizando-se, posteriormente, um menor número de animais experimentais (FRESHNEY, 1994; MELO, DURÁN, HAUN, 2001).

Um dos modelos experimentais utilizados para avaliação da toxicidade *in vitro*, que surge como alternativa aos estudos *in vivo* é a biotécnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA/ Ovário Artificial) e o cultivo de folículos isolados. Várias espécies animais têm sido utilizadas como fonte de obtenção tecido ovariano para a realização desta biotécnica (ABDEL-GHANI; EL-SHERRY; ABDELHAFEEZ, 2016; ACKERMANN *et al.*, 2016; BANDEIRA *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2016; JIMENEZ *et al.*, 2016). A utilização de tecido ovariano de cabras com objetivo de verificar o efeito de diferentes substâncias no desenvolvimento folicular se justifica pelo fato desse animal ter uma foliculogênese semelhante à humana, além da própria estrutura ovariana que também é semelhante.

Desta forma a utilização desta biotécnica é de grande importância para avaliar o efeito citotóxico da frutalina.

4 HIPÓTESES CIENTÍFICAS

Diante do exposto, foram formuladas as seguintes hipóteses científicas:

- A frutalina promove uma redução na ativação de folículos primordiais e na sobrevivência de folículos pré-antrais cultivados *in vitro*.
- A frutalina ocasiona alterações ultra-estruturais nos folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro*.
- A frutalina modula a expressão de RNAm para genes pró- e anti- apoptóticos em folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro*.
- A frutalina apresenta um efeito menos tóxico do que o controle (tóxico) positivo DXR, sobre a sobrevivência, a formação de antro, o crescimento e a expressão do RNAm para genes pró- e anti- apoptóticos em folículos secundários caprinos isolados.

5 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar o efeito citotóxico de diferentes concentrações da frutalina durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos e comparar o efeito tóxico da frutalina com a doxorrubicina.

Objetivos Específicos

- Avaliar a influência de diferentes concentrações de frutalina sobre a ativação, crescimento e características ultra-estruturais de folículos primordiais inclusos em tecido ovariano caprino cultivados *in vitro*.
- Analisar a influência de diferentes concentrações de frutalina sobre a expressão de RNAm para caspases 3 e 6, Bax, Bcl-2, fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e seus receptores (TNFR1 e TNFR2) após o cultivo *in vitro* de folículos primordiais inclusos em tecido ovariano caprino.
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de frutalina sobre o desenvolvimento *in vitro* e viabilidade de folículos secundários caprinos durante 6 dias de cultivo.
- Comparar os efeitos da frutalina e da doxorrubicina sobre os folículos secundários caprinos durante 6 dias de cultivo.
- Verificar a influência da frutalina e doxorrubicina sobre a expressão de RNAm para caspases 3 e 6, Bax e Bcl-2 após o cultivo *in vitro* de folículos secundários por 6 dias.

6 EFFECTS OF FRUTALIN ON EARLY FOLLICLE MORPHOLOGY, ULTRASTRUCTURE AND GENE EXPRESSION IN CULTURED GOAT OVARIAN CORTICAL TISSUE

ABSTRACT

Frutalin is a galactose-binding lectin that has an irreversible cytotoxic effect on HeLa cervical cancer cells, by inducing apoptosis and inhibiting cell proliferation. It was previously shown that after in vitro incubation, frutalin is internalized into HeLa cells nucleus, which indicates that frutalin apoptosis-inducing activity might be linked with its nuclear localization. Considering that drugs commonly used for cancer treatment have a deleterious effect on germ cells, the aim of this study was to evaluate the effect of frutalin on the activation, survival, ultrastructure and gene expression in follicles cultured within ovarian tissue. Goat ovarian fragments were cultured for 6 days in α -MEM⁺ alone or supplemented with frutalin (1, 10, 50, 100 or 200 μ g/ml). Non-cultured and cultured tissues were processed for histological and ultrastructural analysis and they were also stored to evaluate the expression of anti- and pro-apoptotic genes by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The results showed that the frutalin, at all concentrations tested, reduced follicular survival when compared with control medium. Higher concentrations of frutalin (50, 100 or 200 μ g/ml) also reduced follicular survival when compared with those tissues cultured with 1 or 10 μ g/ml of frutalin. The ultrastructural analysis showed that atretic cultured follicles had retracted oocytes and a large number of vacuoles spread throughout the cytoplasm. In addition, signs of damage of mitochondrial membranes and cristae were observed. Moreover, although a dose-response effect on gene expression has not been observed, when compared with tissues culture in control medium, the presence of frutalin increased in mRNA expression pro-apoptotic genes. In conclusion, frutalin reduces follicular survival at all concentrations tested, its

being effects more pronounced when high concentrations of this lectin (50, 100 and 200 $\mu\text{g/ml}$) are used. Gene expression profile and ultrastructural features of cultured follicles suggest that follicular death in goat ovarian tissue cultured in presence of frutalin occurs via necrosis.

Keywords: Frutalin, Ovary, Goat, Follicles

Introduction

Lectins are a well-known group of carbohydrate-binding proteins that mediate a variety of biological processes, especially the recognition of cancer-associated oligosaccharides (Kabir, 1998). Cancer cells exhibit cellular changes in glycosylation (Kim and Varki, 1997) and it has been reported that lectins are able to agglutinate malignantly transformed cells, but not their normal parental cells (Inbar and Sachs, 1969; Fang et al., 2011). In an attempt to develop alternative treatments for cancer diseases, frutalin (a galactose-binding jacalin-related lectin) has received considerable attention because of its biological properties (Brando-Lima et al., 2005; Oliveira et al., 2009; Oliveira et al., 2011). This lectin belongs to the family derived from *Artocarpus incisa* and specifically binds $\alpha\text{-D-galactose}$ (Moreira et al., 1998; Nobre et al., 2010). Previous in vitro studies have shown that frutalin is internalized into HeLa cells nucleus and has an irreversible cytotoxic effect on these cells, by inducing apoptosis and inhibiting cell proliferation (Oliveira et al., 2011). However, it is well known that drugs commonly used for cancer treatment have a deleterious effect on germ cells (Arnon et al., 2001; Akdemir et al., 2014), which results in primordial follicle depletion and, as a consequence, premature menopause, subfertility, infertility and associated symptoms (Jeruss and Woodruff, 2009; Schmidt et al., 2010). Considering that frutalin is capable of inducing apoptosis in cancer cells

(Oliveira et al., 2011) and, thus, may be potentially used in the future as an anticancer agent (Brando-Lima et al., 2005; Oliveira et al., 2009), it is very important to evaluate whether this lectin has deleterious effects on female gametes, e.g., on the oocytes enclosed in primordial follicles.

Primordial follicles are very important for fertility preservation, as they are the most abundant follicle class (Hornick et al., 2012). In primate species, the primordial follicle pool is established shortly before birth (Gougeon, 1996; Bristol-Gould et al., 2006). Females are born with ~1 million primordial follicles, and this number continuously declines with age, as dormant primordial follicles are either lost by degeneration or activated to proceed through folliculogenesis (Faddy et al., 1992; Adhikari and Liu, 2009). Ovarian follicular death, also known as follicular atresia, is an apoptotic process controlled by hormones, and may occur at any stage of development (Carroll et al., 1990; Kaipia and Hsueh, 1997). The balance between several pro-apoptotic (BAX, BCL2-associated X protein) and pro-survival molecules (BCL2, MCL1 and BCLXL) regulates the process of apoptosis in ovarian follicles (Hussein, 2005; Matsuda et al., 2012). Tumor necrosis factor- α (TNF alfa) and its receptors (TNFRI and TNFRII) also have critical roles in the induction of apoptosis. The action of this factor is through interaction with its receptors on the cell surface, resulting in the aggregation of receptors and recruitment of signaling proteins. The TNFRI acts through its death domain in its cytoplasmic region, which interacts with the intracellular transducer and results in aggregation and activation molecules, such as caspases, leading to cell death (Hussein, 2005). However, it is unknown whether frutalin regulates the expression of mRNAs for factors involved in apoptosis, nor if it induces morphological or ultrastructural changes in primordial follicles cultured within goat ovarian cortical tissue.

The aim of this study was to evaluate the effect of different concentrations of frutalin on follicular activation, survival, ultrastructure, and expression of mRNA for *TNFA* and its receptor (*TNFR1*), as well as that for *BCL2*, *BAX* and the *CASPASES 3* and *6*, after 6-days culture of caprine ovarian cortical tissue. This species was chosen because it has been successfully used as an experimental model for studying the causes, mechanisms and therapy of human diseases (Haldar and Ghosh, 2014).

Methods

Chemicals

Unless mentioned otherwise, the culture media and other chemicals used in the present study were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO).

Isolation and purification of frutalin

Mature seeds from *Artocarpus incisa* L. were cut into small fragments, dried in acetone (P.A) and ground into a fine powder using a coffee mill. The powder was incubated at a 1:10 ratio (w/v) in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) at room temperature with continuous stirring for 2 h before centrifugation at 10 000 x g for 20 min at 5 °C. The supernatant (crude extract) was precipitated with ammonium sulfate (0-90% of saturation, $F_{0/90}$) and centrifuged at 12 000 x g for 30 min at 5 °C. The pellet was suspended and dialyzed in PBS pH 7.4. The protein solution ($F_{0/90}$) was applied to an agarose–D-galactose column (8 x 1 cm) equilibrated with the same buffer. After removing the unbound material, frutalin was eluted with 100 mM D-galactose in an equilibrium solution. The presence and purity of the lectin in the pooled fractions were

checked by SDS-PAGE 15%. Fractions containing pure frutalin were dialyzed against PBS pH 7.4 and concentrated in 10 KDa Amicon® (Millipore) tubes (Moreira et al., 1998).

Effect of different concentrations of frutalin on survival and growth of primordial follicles

Ovaries (n= 12) were obtained from six cross-breed goats (*Capra hircus*) collected at a slaughterhouse. Immediately postmortem, ovaries were washed in 70% alcohol for 10 sec followed by two times in saline solution (0.9% NaCl) containing antibiotics (100 IU/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin). Ovaries were transported within 1 h to the laboratory in a saline solution containing antibiotics at 4°C.

The culture system was earlier described in detail by Ribeiro et al. (2015). Briefly, ovarian cortical tissue from the same ovarian pair was cut in 21 slices (3 mm x 3 mm x 1 mm) using scissors and scalpel under sterile conditions. The tissue pieces were distributed for the following analyses: transmission electron microscopy (one fragment), classical histology (one fragment) and polymerase chain reaction (PCR) (one fragment) in uncultured control. The remaining fragments were cultured for 6 days (three fragments per treatment). Cortical tissues were transferred to 24-well culture dishes containing 1 mL of culture media. Culture was performed at 39°C in 5% CO₂ in a humidified incubator. The basic culture medium consisted of α -MEM (pH 7.2-7.4) supplemented with ITS (10 μ g/mL insulin, 5.5 μ g/mL transferrin, and 5 ng/mL selenium), 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine, antibiotics 100 IU/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin, 50 μ g/mL ascorbic acid, 3.0 mg/mL of bovine serum albumin (α -MEM⁺). The ovarian cortical fragments were cultured in control medium (α -MEM⁺) alone or supplemented with different concentrations of frutalin (1, 10, 50, 100 or 200 μ g/mL). Every 2 days, the culture medium was replaced with fresh medium. After culture in each treatment,

fragments were fixed for classical histology, transmission electron microscopy or stored at - 80°C for PCR. This procedure was repeated six times.

For histological studies, after six days of culture, the pieces of ovarian tissue were fixed overnight at room temperature in 4% paraformaldehyde in PBS pH 7.4. After fixation, the ovarian fragments were dehydrated in a graded series of ethanol, clarified with xylene, and embedded in paraffin. For each piece of ovarian cortex, 7 µm sections were mounted on slides and stained with eosin and hematoxylin. Coded anonymized slides were examined under a microscope (Nikon, Tokyo, Japan) at x100 and x400 magnification. The developmental stages of follicles were classified as primordial follicles (one layer of flattened or flattened and cuboidal granulosa cells around the oocyte) or growing follicles (primary: one layer of cuboidal granulosa cells, and secondary: two or more layers of cuboidal granulosa cells around the oocyte) (Silva et al., 2004).

These follicles were further classified individually as histologically normal when an intact oocyte was present, surrounded by granulosa cells that were well organized in one or more layers, and had no pyknotic nucleus. Degenerated follicles were defined as those with a retracted oocyte with a pyknotic nucleus and/or surrounded by disorganized granulosa cells detached from the basement membrane. Overall, a number ranging from 247 to 398 follicles were evaluated for each treatment. The percentages of healthy primordial and developing follicles were calculated before (fresh control) and after culture in a particular medium.

Ultrastructural analysis of cultured ovarian tissue

To better examine follicular morphology, transmission electron microscopy (TEM) was performed to analyze the ultrastructure of normal follicles from uncultured and cultured tissues, as well as from follicles with signs of atresia after 6 days of culture. Experiments and analyses

involving electron microscopy were performed in the Center of Microscopy at the Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil (<http://www.microscopia.ufmg.br>). A portion with a maximum dimension of 1 mm³ was cut from each fragment of ovarian tissue and fixed in Karnovsky solution (4% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 mol/l sodium cacodylate buffer, pH 7.2) for 3 h at room temperature. Specimens were post-fixed in 1% osmium tetroxide, 0.8% potassium ferricyanide and 5 mM calcium chloride in 0.1 M sodium cacodylate buffer for 1 h at room temperature, washed in sodium cacodylate buffer and counterstained with 5% uranyl acetate. The samples were then dehydrated through a gradient of acetone solutions and thereafter embedded in epoxy resin (Epoxy-Embedding Kit, Fluka Chemika-BioChemika). Afterwards, semi-thin sections (2 µm) were cut, stained with toluidine blue and analyzed by light microscopy at a 400× magnification. Subsequently, ultra-thin sections were counterstained with uranyl acetate and lead citrate and examined under an electron microscope Tecnai G2 Spirit for Life Sciences. The density and integrity of ooplasmic and granulosa cell organelles, as well as vacuolization, and basement membrane integrity were evaluated.

Expression of mRNA for *TNFA*, *TNFR1*, *CASPASE 3*, *CASPASE 6*, *BAX* and *BCL2* in cultured cortical tissue

To evaluate the effects of frutalin on the mRNA expression of *TNFA*, TNF receptor I (*TNFR1*), TNF receptor II (*TNFR2*), *CASPASE 3*, *CASPASE 6*, *BAX* and *BCL2*, for each treatment and for uncultured control, two fragments were collected and then stored at -80°C until extraction of total RNA, being in total 14 pieces of ovarian cortex per animal. 6-day cultured 2 fragments from each treatment. Total RNA extraction was performed using a Trizol® purification kit (Invitrogen, São Paulo, Brazil). According to the manufacturer instructions, 800µl

of Trizol solution were added to each frozen sample and the lysate was aspirated through a 20-gauge needle before centrifugation at 10 000 g for 3 min at room temperature. Thereafter, all lysates were diluted 1:1 with 70% ethanol and subjected to a mini-column. After binding of the RNA to the column, DNA digestion was performed using RNase-free DNase (340 Kunitz units/mL) for 15 min at room temperature. After washing the column three times, the RNA was eluted with 30 µl RNase-free water.

The RNA concentration was estimated by reading the absorbance at 260 nm and was checked for purity at 280 nm in a spectrophotometer (Amersham Biosciences, Cambridge, UK) and 2 µg of total RNA was used for reverse transcription. Before the reverse transcription reaction, samples of RNA were incubated for 5 min at 70° C and then cooled in ice. Reverse transcription was performed in a total volume of 20 µl, which was comprised of 10 µL of sample RNA, 4 µL 5X reverse transcriptase buffer (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 8 units RNase out, 150 units Superscript III reverse transcriptase, 0.036 U random primers (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 10 mM DTT, and 0.5 mM of each dNTP. The mixture was incubated for 1 h at 42° C, for 5 min at 80°C, and then stored at 20°C.

Negative controls were prepared under the same conditions, but without the inclusion of the reverse transcriptase. Quantification of mRNA was performed using SYBR Green. PCR reactions were composed of 1 µL cDNA as a template in 7.5 µL of SYBR GreenMaster Mix (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 5.5 µL of ultra-pure water, and 0.5 M of each primer. The primers were designed by using the Primer QuestSM program (<http://www.idtdna.com>) to perform amplification of *TNFA*, *TNFRI*, *TNFRII*, *CASPASE 3*, *CASPASE 6*, *BAX* and *BCL2*, and housekeeping gene *BACTINA* (Table 1). The specificity of each primer pair was confirmed by melting curve analysis of PCR products. The thermal cycling profile for the first round of PCR was: initial denaturation and activation of the polymerase for 10 min at 95°C,

followed by 40 cycles of 15 s at 95°C, 30 s at 58°C, and 30 s at 72°C. The final extension was for 10 min at 72°C. All reactions were performed in a real-time PCR Realplex (Eppendorf, Germany). The $\Delta\Delta C_t$ method was used to transform the C_t values into normalized relative expression levels (Livak and Schmittgen, 2001).

Statistical analysis

The percentages of primordial and developing follicles, as well as of those classified as morphologically normal after 6 days of culture in medium supplemented with different concentrations of frutalin were compared by Fisher's exact test (Graph pad Instat). Levels of mRNA for *TNFA*, *TNFR1*, *TNFR2*, *CASPASE 3*, *CASPASE 6*, *BAX* and *BCL2*, in cultured fragments were analyzed by using the non-parametric KruskalWallis test ($P < 0.05$), and the values were expressed as mean \pm stand and error of the mean (sem). The differences were considered significant when $P < 0.05$.

Results

Effect of different concentrations of frutalin on survival and activation of primordial follicles

Histological analysis showed the presence of normal (Fig. 13A) and degenerated (Fig.13B) follicles in cultured ovarian cortical fragments. Degenerated follicles had a shrunken oocyte, with pyknotic nucleus or disorganized granulosa cells. After 6 days, the percentage of normal follicles after culture of ovarian tissue in α -MEM⁺ alone or supplemented with different concentrations of frutalin (0, 1, 10, 50, 100 or 200 μ g/ml) decreased significantly when compared with that of uncultured follicles from fresh control. In addition, the percentage of normal follicles

after culture in medium with 1, 10, 50, 100 or 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of frutalin was significantly lower than that of tissues cultured in $\alpha\text{-MEM}^+$ alone. Moreover, the percentage of normal follicles after culture in medium with 50, 100 or 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of frutalin was significantly reduced when compared with that of tissues cultured in medium with 1 or 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of frutalin (Fig. 14).

After 6 days culture of ovarian fragments in the different media, a significant reduction in the percentage of primordial follicles (Fig. 15A) and an increase in the percentage of developing follicles were observed, when compared with the respective percentages within fresh uncultured tissues ($P < 0.05$). At all concentrations tested, the presence of frutalin in culture media did not influence the percentage of developing follicles *in vitro* compared to what was found in tissues cultured in $\alpha\text{-MEM}^+$ alone (Fig. 15B).

Ultrastructural aspects of follicles before and after culture

Normal primordial follicles from uncultured tissues exhibited sparse vesicles spread throughout the cytoplasm in all the oocytes and regular nuclear membrane. Oocyte and granulosa cells were well connected. Granulosa cells had irregularly-shaped nuclei, with a high nuclear-to-cytoplasm ratio. The cytoplasm contained a great number of elongated mitochondria with lamellar cristae, as well as endoplasmic reticulum. The oocyte cytoplasm also contained numerous rounded mitochondria with peripheral cristae and continuous mitochondrial membranes, although there were occasional elongated forms with parallel cristae. Golgi complexes were rarely observed. Both, smooth and rough endoplasmic reticula were present, either as isolated aggregations or as complex associations with mitochondria and vesicles (Fig. 16 and 17). Normal follicles from cultured tissues had similar characteristics (Fig. 18), except for a discreet increase in the number of vacuoles and a higher number of elongated mitochondria (Fig. 19). Connections between oocyte and granulosa cells were also seen (Fig. 20).

Degenerated follicles from cultured tissues had a retracted oocyte and large irregularity of the follicular, oocyte and nuclear outlines. In the oocyte, a large number of vacuoles spread throughout the cytoplasm were seen (Fig. 21A). In addition, signs of damage to mitochondrial membranes and cristae were observed. Granulosa cells had a swollen aspect, with a low density of organelles in their cytoplasm (Fig. 21B). Granulosa cells had lost their connections with the oocyte basement membrane while a rupture in their cytoplasmic membrane was observed. Generally, organelles were unrecognizable in granulosa cells (Fig. 21B). In tissues cultured in the presence of frutalin, fragmented follicles and stromal cells were commonly observed (Fig. 21A and B).

Effects of frutalin on gene expression in cultured cortical tissue

After comparing the levels of mRNA between uncultured tissues and tissues cultured in control medium, most of the mRNAs had their levels reduced after culture. However, only the expression of mRNAs for TNFRI was significantly lower than those seen in uncultured control. In contrast, cultured tissues had higher levels of mRNA for BAX than those seen in uncultured control (Fig. 22).

When compared with tissues cultured only in control medium (α -MEM⁺), the presence of 10 μ g/ml frutalin significantly increased the levels of mRNA for *TNFA* (Fig. 23A), *CASPASE 6* (Fig. 23E) and *BAX* (Fig. 23F). The levels of mRNA for *BAX* (Fig. 23F) were also higher in ovarian tissues cultured in medium containing 100 μ g/mL of frutalin than those cultured in control medium. In addition, the levels of mRNA of *CASPASE 3* (Fig. 23D) were significantly increased in ovarian tissues cultured in medium containing 50 and 200 μ g/ml frutalin compared to α -MEM⁺. The presence of 200 μ g/mL frutalin also increased the levels of mRNA of *TNFR1*

(Fig. 23B), TNFR2 (Fig. 23C) and *BCL2* (Fig. 23G) when compared to tissues cultured in α -MEM⁺ alone.

Discussion

Frutalin is a tetrameric lectin expressed in breadfruit plant seeds (Monteiro-Moreira et al., 2015) that, similarly to other galactose-binding lectins [e.g. jacalin (Kabir, 1998)], has successfully been used in immunobiological research on cell recognition (Brando-Lima et al., 2005; Oliveira et al., 2009). This study shows for the first time that frutalin does not influence caprine ovarian-cortical-tissue-enclosed primordial follicle activation *in vitro*, most of the follicles spontaneously started growth in all cultures inclusive the control medium. Similar results have been described for bovine cortical tissue pieces cultured in serum-free control medium (Wandji et al., 1996; Braw-Tal and Yossef, 1997) and those from sheep (Santos et al., 2014). To explain the massive growth of primordial follicles during *in vitro* culture, Cushman et al. (2002) suggested that an inhibitor of medullary origin regulates activation *in vivo* and that separation of the cortex from medulla causes primordial follicles to activate *in vitro*. However, more recently, Kawamura et al. (2013) demonstrated that ovarian fragmentation increased actin polymerization and disrupted the Hippo signaling pathway, leading to increased expression of growth factors. Secreted connective tissue growth factor and related factors promoted primordial follicle growth *in vitro* (Hsueh et al., 2015). Our current data furthermore show decreased follicular survival in all media containing frutalin, the effect being stronger (\pm 50% decrease) in the presence of relatively high concentrations (50-200 μ g/mL) of this compound, than in the media with lower concentrations (1 and 10 μ g/mL; \pm 30% decrease). Thus, frutalin has a deleterious effect on caprine primordial follicles *in vitro*. Despite this, the still relatively high survival rate of ovarian follicles after culture in the presence of low concentrations of frutalin strengthens our hope for

the development of an anticancer therapy that results in less severe damage to the ovarian follicle population. Previous *in vitro* studies have shown concentrations higher than 18 μ g/mL have a toxic effect on HeLa cells, but, probably, an *in vivo* effect on cancer cells will require higher concentrations. It is clear that, apart from the concentration of the drug in the culture medium, other aspects, such as its half-life and metabolism, should be taken into account in future studies, but such studies open up numerous prospects for progress in this area. It is important to note that frutalin was previously used as a histochemical biomarker for prostate cancer (Oliveira et al., 2009).

The present study shows morphological and ultrastructural changes that occur during degeneration of caprine preantral follicles enclosed in ovarian cortical tissues that have been cultured in the presence of frutalin. Ultrastructural analysis shows that healthy follicles have oocyte and granulosa cells well connected while the oocyte contains sparse vesicles spread throughout the cytoplasm, a great number of mitochondria with lamellar cristae and well-developed rough endoplasmic reticulum. In contrast, cultured follicles that became atretic have retracted oocytes, large numbers of vacuoles throughout the cytoplasm, and swollen granulosa cells, with a low density of organelles. In addition, signs of damage to mitochondrial membranes and cristae were observed. Similar changes were previously described in goat ovaries stored *in vitro* (Silva et al., 2002). The observed morphological and ultrastructural changes indicate that the concerned atretic follicular cells undergo cell death by necrosis, a process different from apoptosis (Ziegler and Groscurth, 2004; Celestino et al., 2009). The main features of cells dying by necrosis are increased cell volume, chromatin aggregation, large vacuolization in the cytoplasm, disruption of cytoplasm, loss of plasma membrane integrity and subsequent cell disruption (Fink and Cookson, 2005). Cellular necrosis has long been regarded as an incidental and uncontrolled form of cell death. In contrast, the morphology associated with apoptosis is

characterized by nuclear and cytoplasmic condensation and cellular fragmentation into membrane-bound fragments. These fragments or apoptotic bodies are taken up by other cells and degraded within phagosomes (Fink and Cookson, 2005). A new regulated form of cell death, termed necroptosis, has been identified recently. Necroptosis is a form of caspase-independent programmed cell death associated with morphological changes similar to those that occur in necrosis (Preyat et al., 2016). Necroptosis can be induced by extracellular cytokines, pathogens, and several pharmacological compounds. Interestingly, most ligands known to induce necroptosis, including, notably, *TNF- α* , can also promote apoptosis (Preyat et al., 2016). Autophagy, another form of cell death, features degradation of cellular components within the dying cell in autophagic vacuoles (Clarke, 1990). The morphological characteristics of autophagy include vacuolization, degradation of cytoplasmic contents, and slight chromatin condensation (Fink and Cookson, 2005). Since some of these features were also seen in degenerated follicles, the possibility that autophagy can also be involved cannot be excluded.

Real time PCR has shown that tissues cultured in control medium had reduced levels of mRNA for *TNFR1*, but increased expression of *BAX*, showing that the culture system itself influences gene expression. Despite the absence of a dose-response effect of frutalin on the expression of genes for *TNFA*, *TNFR1*, *TNFR2*, *CASPASE 3* and *6*, *BAX* and *BCL2*, this lectin increased the mRNA expression of pro-apoptotic genes (*TNF α* [frutalin 10 $\mu\text{g/mL}$], *TNFR1* [frutalin 200 $\mu\text{g/mL}$], *CASPASE 3* [frutalin 50 and 200 $\mu\text{g/mL}$], *CASPASE 6* [frutalin 10 $\mu\text{g/mL}$], and *BAX* [frutalin 10 $\mu\text{g/mL}$]). It is well known that *TNF α* is able to elicit pro-apoptotic signals in various cellular types (Sethu and Melendez, 2011) and that *TNFR1* contains an intracellular death domain that is necessary for signaling pathways associated with apoptosis (Hsu et al., 1995). After binding to its receptor, *TNF α* triggers pro-apoptotic pathways, such as the loss of mitochondrial membrane potential and activation of terminal proteases, such as the caspase-3

family of proteases (Miyashita et al., 1998). TNFRII does not contain a death motif but still recruits adaptor proteins including TRAF2, and thus, it is thought to be able to signal apoptosis (reviewed by MacEwan, 2002). After receiving the death signals, the pro-apoptotic BAX protein allows cytochrome c to leak out of the mitochondria, which then activate, the caspase cascade, leading to cell death (Hussein, 2005). CASPASE 3 activation has been associated with the execution phase of apoptosis and has previously been reported to mediate proteolysis of numerous cellular substrates, including the nuclease DFF40/CAD, which cleaves DNA into oligonucleosomes, poly(ADP ribose)polymerase, protein kinase C δ , and U1–70 kDa (Lazebnik et al., 1994; Ghayur et al., 1996; Rosen and Casciola-Rosen, 1997). In addition, caspase 6 cleaves lamins during apoptotic cell death (Orth et al., 1996).

Considering that the population of normal follicles has significantly decreased and both ultrastructural changes indicative of necrosis and a transiently increased expression of pro-apoptotic genes has been detected after culture of ovarian tissue in the presence of frutalin, it is concluded that under these circumstances frutalin is able to trigger follicular cell death mainly via necrotic or necroptotic pathway. Several lectins possess proapoptotic and proautophagic properties in cancer cell lines (Fu et al., 2011; Li et al., 2011) and Oliveira et al. (2011) reported that frutalin induces apoptosis of HeLa cells. In contrast to apoptosis, necroptosis is largely independent of executioner caspases, such as CASPASE 3, 6 and 7 (Preyat et al., 2016). Although necroptosis often appears to occur when apoptosis is abortive, such as in situations of caspase inhibition (Preyat et al., 2016), the cellular factors regulating the choice between these two forms of regulated cell death have not been fully uncovered. To reinforce the possibility that the apoptotic pathway may have been interrupted, an unexpected increase in the expression of *BCL2* mRNA was seen after culture of ovarian tissue in the presence of frutalin (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The expressed factor is a membrane-associated protein that resides in the nuclear envelope and

mitochondria and exerts its pro-survival functions by modulating the mitochondrial the release of cytochrome c (Hussein, 2005).

Conclusions

The putative anticancer lectin frutalin does not influence *in-vitro* caprine primordial follicle activation. Frutalin, however, reduces *in-vitro* follicular survival, although at low concentrations (1 and 10 $\mu\text{g/mL}$) the percentage of healthy follicles is still high (>60%). Ultrastructural features of cultured follicles demonstrate that necrosis is the main type of cell death in follicles cultured in the presence of frutalin. Since this lectin, depending on the concentration, has low to moderate toxic effect on early follicles, future studies to evaluate the effects of frutalin on ovarian, oocyte and embryo function *in vivo* are needed to determine the consequences of this treatment for patients.

Abbreviations

TNFA, tumor necrosis factor-[alpha]; TNFRI, Tumor necrosis factor receptor 1; TNFRII: Tumor necrosis factor receptor 2; BAX, BCL2-Associated X Protein; BCL2, B cell lymphoma gene 2; MEM, Minimum essential medium.

Acknowledgements

This research was supported by grants from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil, grant number 407153/2013-6). The authors acknowledge the Center for Microscopy of the Federal University of Minas Gerais for providing the equipment and technical support for experiments involving electron microscopy.

References

Adhikari D. and Liu K. (2009). Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocr Rev.* 30, 438-464.

Akdemir A., Zeybek B., Akman L., Ergenoglu A.M., Yeniel A.O., Erbas O., Yavasoglu A., Terek M.C. and Taskiran D. (2014). Granulocyte-colony stimulating factor decreases the extent of ovarian damage caused by cisplatin in an experimental rat model. *J Gynecol Oncol.* 25, 328-333.

Arnon J., Meiorow D., Lewis-Roness H. and Ornoy A. (2001). Genetic and teratogenic effects of cancer treatment on gametes and embryos. *Hum Reprod.* 7, 394-403.

Brando-Lima A.C., Saldanha-Gama R.F., Henriques M.D., Monteiro-Moreira A.C., Moreira R.A. and Barja-Fidalgo C. (2005). Frutalin, a galactose-binding lectin, induces chemotaxis and rearrangement of actin cytoskeleton in human neutrophils: involvement of tyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase. *Toxicol Appl Pharmacol.* 15, 208, 145-54.

Braw-Tal R. and Yossef S. (1997). Studies *in vivo* and *in vitro* on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J Reprod Fertil.* 109, 165-171.

Bristol-Gould S.K., Kreeger P.K., Selkirk C.G., Kilen S.M., Mayo K.E., Shea L.D. and Woodruff T. K. (2006). Fate of the initial follicle pool: empirical and mathematical evidence supporting its sufficiency for adult fertility. *Dev Biol.* 298, 149-154.

Carroll J., Whittingham D.G., Wood M.J., Telfer E. and Gosden R.G. Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. (1990). *J Reprod Fert.* 90, 321-327.

Celestino J.J.H., Chaves R.N., Matos M.H.T., Saraiva M.V.A., Silva J.R.V., Bruno J.B., Maia-Júnior J.E. and Figueiredo J.R. (2009). Mechanisms of atresia in ovarian follicles. *Anim Reprod.* 6: 495-508.

Clarke P.G. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. (1990). *Anat Embryol.* 181, 195–213.

Cushman R.A., Wahl C.M. and Fortune J.E. Bovine ovarian cortical pieces grafted to chick embryonic membranes: a model for studies on the activation of primordial follicles. (2002). *Hum Reprod.* 17, 48-54.

Faddy M.J., Gosden R.G., Gougeon A., Richardson S.J. and Nelson J.F. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. (1992). *Hum Reprod.* 7, 1342-1346.

Fang E.F., Pan W.L., Wong J.H., Chan Y.S., Ye X.J. and Ng T.B. (2011). A new *Phaseolus vulgaris* lectin induces selective toxicity on human liver carcinoma Hep G2 cells. *Arch Toxicol.* 85, 1551–1563.

Fink S.L. and Cookson B.T.(2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun.* 73, 1907-1916.

Fu L.L., Zhou C.C., Yao S., Yu J.Y., Liu B. and Bao J.K. (2011). Plant lectins: Targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. *Int J Biochem Cell Biol.* 43, 1442-1449.

Ghayur T., Hugunin M., Talanian R. V., Ratnofsky S., Quinlan C., Emoto Y., Pandey P., Datta R., Huang Y., Kharbanda S., Allen H., Kamen R., Wong W. and Kufe D. (1996). Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE/CED 3-like protease induces characteristics of apoptosis. *J Exp Med.* 184, 2399–2404.

Gougeon A. (1996). Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev.* 17, 121-155.

Haldar C. and Ghosh S. (2014). Immune Modulation in Goats by Melatonin and Other Hormones: A Novel Horizon of Research. *J Immun Res.* 1:1-7.

Hornick J.E., Duncan F.E., Shea L.D. and Woodruff T.K. (2012). Isolated primate primordial follicles require a rigid physical environment to survive and grow in vitro. *Hum Reprod.* 27(6), 1801-1810.

Hsu H., Xiong J. and Goeddel D.V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell.* 81, 495-504.

Hsueh A. J., Kawamura K., Cheng Y. and Fauser B. C. (2015). Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocr Rev.* 36, 1–24.

Hussein M. R. (2005). Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum Reprod Update.* 2005; 1-17.

Inbar M. and Sachs L. (1969). Interaction of the Carbohydrate-Binding protein Concanavalin A with normal and transformed cells. *Proc Natn Acad Sci.* 63, 1418–1425.

Jeruss J.S. and Woodruff T.K.(2009). Preservation of fertility in patients with cancer. *New Engl J Med.* 360, 902-911.

Kabir S. (1998). Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research. *J. Immunol. Methods.* 212, 193–211.

Kaipia A. and Hsueh A.J. (1997). Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu Ver Physiol.* 59, 349–363.

Kawamura K., Cheng Y., Suzuki N., Deguchi M., Sato Y., Takae S., Ho C. H., Kawamura N., Tamura M., Hashimoto S., Sugishita Y., Morimoto Y., Hosoi Y., Yoshioka N., Ishizuka B. and Hsueh A. J. (2013). Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 22, 110-143.

- Kim Y. J and Varki A.(1997). Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Glycoconj J.* 14, 569-576.
- Lazebnik Y. A.,Kaufmann S. H.,Desnoyers S.,Poirier G. G. and Earnshaw W.C. (1994). Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature.* 371, 346–347.
- Li W.W.,Yu J.Y.,Xu H. L. and Bao J. K. (2011). Concanavalin A: a potential antineoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. *Biochem Biophys Res Commun.* 14, 282–286.
- Livak K. J. and Schmittgen T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* 25, 402–408.
- MacEwan D. J. (2002). TNF ligands and receptors - a matter of life and death. *British Journal of Pharmacology.* 135, 855-875.
- Matsuda F.,Inoue N.,Manabe N. and Ohkura S. (2012). Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. *J Reprod Dev.* 58, 44-50.
- Miyashita T.,Nagao K.,Krajewski S.,Salvesen G. S.,Reed J. C.,Inoue T. and Yamada M. (1998). Investigation of glucocorticoid-induced apoptotic pathway: processing of caspase 6 but not caspase-3. *Cell Death Differ.* 5, 1034-1041.
- Monteiro-Moreira A.C.,Pereira H.D.,Vieira Neto A.E.,Moreno F.B.M.B.,Lobo, M.D. P.,Sousa F.D. and Moreira R. A. (2015). Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of frutalin, an -D-galactose-specific lectin from *Artocarpus incisa* seeds. *Acta Cryst.* 7, 1282-1285.
- Moreira R.A.,Castelo-Branco C.C.,Monteiro A.C.,Tavares R.O. and Beltramini L.M.(1998). Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. *Phytochemistry.* 47, 1183-1188.
- Nobre T.M.,Pavinatto F.J.,Cominetti M.R.,Selistre de Araújo H.S.,Zaniquelli M.E. and Beltramini L.M. (2010). The specificity of frutalin lectin using biomembrane models. *Biochim Biophys Acta.* 8: 1547–1555.
- Oliveira C.,Texeira J.A.,Schmitt F. and Domingues L.(2009) A comparative study of recombinant and native frutalin binding to human prostate tissues. *BMC Biotechnology.* 9, 78.
- Oliveira C.,Nicolau A.,Texeira J. A. and Domingues L. (2011). Cytotoxic effects of native and recombinant frutalin, a plant galactose-binding lectin, on HeLa cervical cancer cells. *J Biomed Biotechnol.* doi:10.1155/2011/568932.
- Orth K.,Chinnaiyan A.M.,Garg M.,Froelich C.J. and Dixit V.M.(1996). The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. *J Biol Chem.* 271, 16443–16446.

Preyat N., Rossi M., Kers J., Chen L., Bertin J., Gough P. J., Le Moine A., Rongvaux A., Van Gool F. and Leo O. (2016). Intracellular nicotinamide adenine dinucleotide promotes TNF-induced necroptosis in a sirtuin-dependent manner. *Cell Death Differ.* 23, 29-40.

Ribeiro R.P., Portela A.M., Silva A.W., Costa J.J., Passos J.R., Cunha E.V., Souza G.B., Saraiva M.V., Donato M.A., Peixoto C.A., Van den Hurk R. and Silva J.R. (2015). Effects of jacalin and follicle-stimulating hormone on *in vitro* goat primordial follicle activation, survival and gene expression. *Zygote.* 23(4), 537-549.

Rosen A. and Casciola-Rosen L. (1997). Macromolecular substrates for the ICE-like proteases during apoptosis. *J Cell Biochem.* 64, 50-54.

Santos J.M.S., Menezes V.G., Barberino R.S., Macedo T.J.S., Lins T.L.B., Gouveia B.B., Barros V.R.P., Santos L.P., Goncalves R.J.S. and Matos M.H.T. (2014). Immunohistochemical localization of Fibroblast Growth Factor-2 in the sheep ovary and its effects on pre-antral follicle apoptosis and development *in vitro*. *Reprod Domest Anim.* 49, 522-528.

Schmidt K., Larsen E.C., Andersen C.Y. and Andersen N.A. (2010) Risk of ovarian failure and fertility preserving methods in girls and adolescents with a malignant disease. *BJOG.* 117, 163-174.

Sethu S. and Melendez A. J. (2011). New developments on the TNF α -mediated signaling pathways. *Biosci Rep.* 31: 63 - 76.

Silva J.R.V., Ferreira M.A.L., Costa S.H.F., Santos R.R., Carvalho F.C.A., Rodrigues A.P.R., Lucci C.M., Bao S.N. and Figueiredo J.R. (2002). Degeneration rate of preantral follicles in the ovaries of goats. *Small Ruminant. Res.* 43, 203-209.

Silva J.R.V., Van den Hurk R., Costa S.H., Andrade E.R., Nunes A.P., Lobo R.N.B. and Figueiredo J.R. (2004). Survival and growth of goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. *Anim. Reprod. Sci.* 81:273-286.

Wandji S.A., Eppig J.J. and Fortune J.E. (1996). FSH and growth factors affect the growth and endocrine function *in vitro* of granulosa cells of bovine preantral follicles. *Theriogenology.* 45, 817-832.

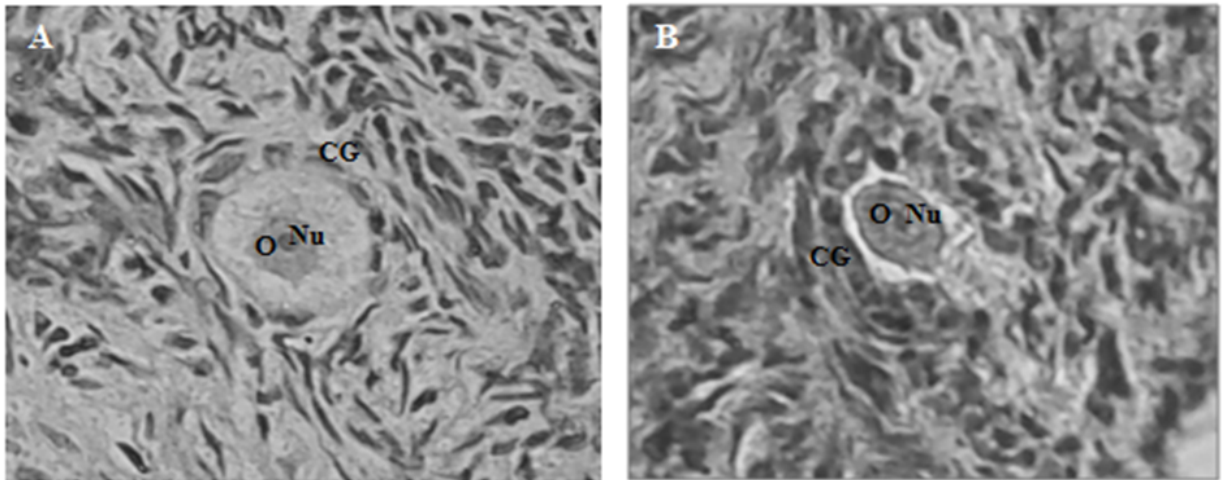
Ziegler U. and Groscurth P. (2004). Morphological features of cell death. *News Physiol Sci.* 19:124-128.

Figures and tables

Table 3 - Primer pairs used in real-time PCR

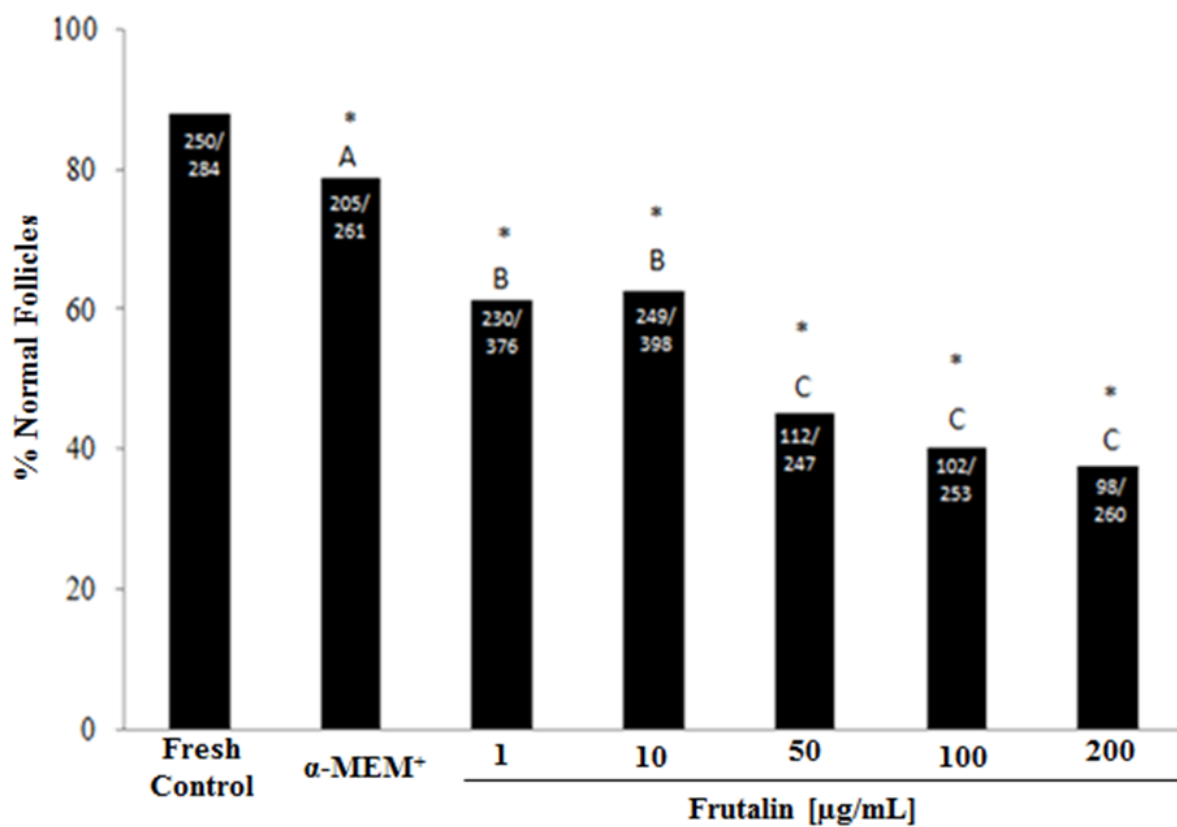
Target gene	Primer sequence (5'→3')	Sense (s) anti- sense(s)	Position	GenBank accession no.
<i>TNFα</i>	CCACGTTGTAGCCGACATCA ATGAGGTAAAGCCCGTCAGC	s as	466–485 578–597	GI:402693442
<i>TNFR1</i>	CTGGTGATTGTCTTCGGGCT TGCCCGCAAATGATGGAGTA	s as	936–955 1020–1039	GI:2290397
<i>TNFR2</i>	GTAGCTCAGAGGCGTCTTCC GCCGCTGCAAACATTGACA	s as	102-121 157-175	GI: 2613148
<i>CASPASE 3</i>	CACGGAAGCAAATCAGTGGAC CGACAGGCCATGCCAGTATT	s as	73-93 181-200	GI: 379067369
<i>CASPASE 6</i>	ACTCCGTGGCAGAAGGTTATTA TGAGAAACCTTCCTGTTACCA	s as	589-610 712-733	GI: 548469419
<i>BAX</i>	GCCCTTTTCTACTTTGCCAGC GGCCGTCCCAACCACCC	s as	334-354 465-481	GI: 41386763
<i>BCL2</i>	GGTAGGTGCTCGTCTGGATG GGCCACACACGTGGTTTTAC	s as	2317-2336 2421-2440	GI: 22652876
<i>BACTIN</i>	ACCACTGGCATTGTCATGGACTCT TCCTTGATGTCACGGACGATTCC	s as	187–211 386–410	GI: 28628620

Fig. 13. Histological section of uncultured tissue showing a normal primordial follicle (A) and a degenerated primary follicle (B). Degenerated follicle had a shrunken oocyte, with pyknotic nucleus or disorganized granulosa cells.



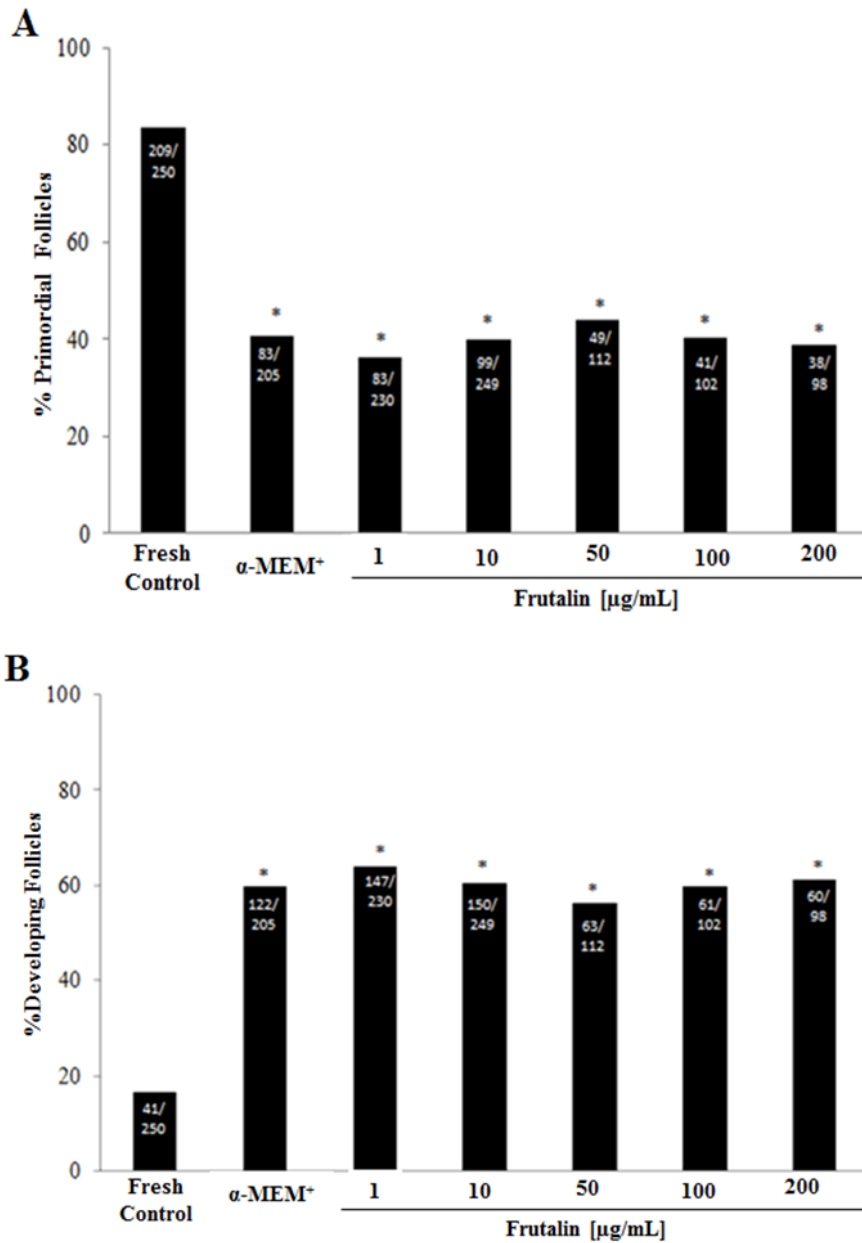
Symbols: O, oocyte; Nu, nucleus; GC, granulosa cells (original magnification $\times 400$).

Fig. 14. Percentages of normal follicles in fresh control and after culture in α -MEM⁺ supplemented with frutalin (1, 10, 50, 100 or 200 μ g/mL). Follicle counts from a total of six goats were pooled.



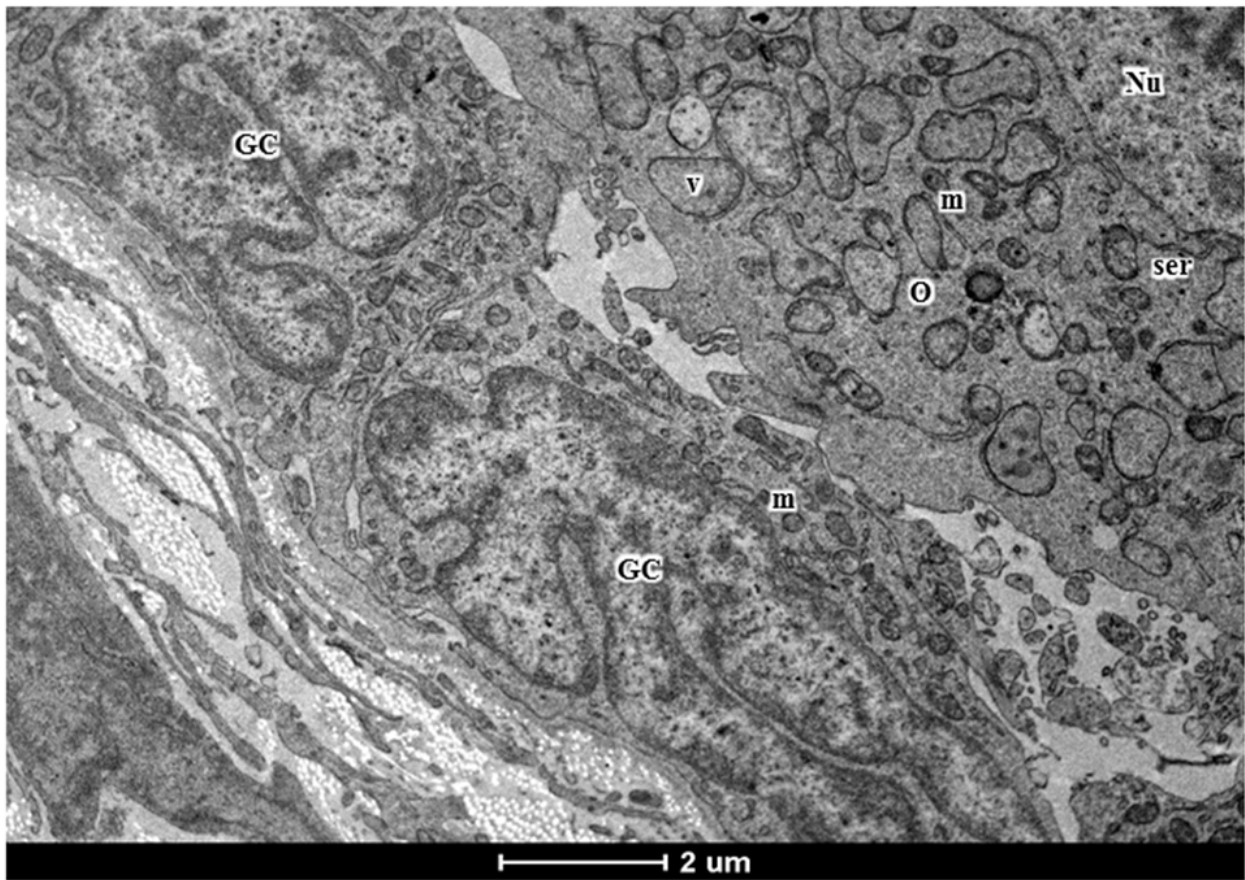
Symbols: * Differs significantly from fresh control; ^{A,B,C} Differences between treatments after 6 days.

Fig. 15. Percentages of follicles in fresh control and after culture in α -MEM+ supplemented with frutalin (1, 10, 50, 100 or 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Follicle counts from a total of six goats were pooled. A) primordial follicles; B) developing follicles.



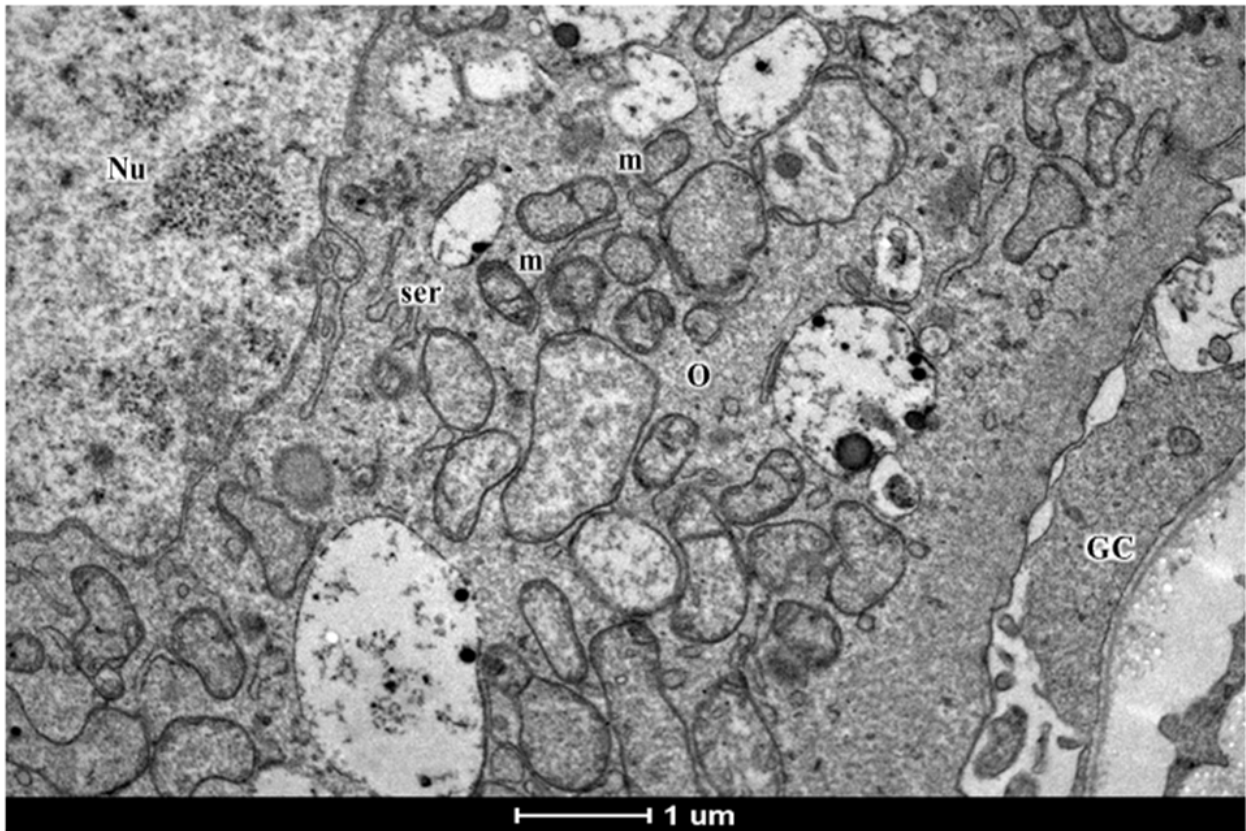
Symbols: * Differs significantly from fresh control.

Fig. 16. Electron micrograph of a normal primordial follicle from uncultured tissue.



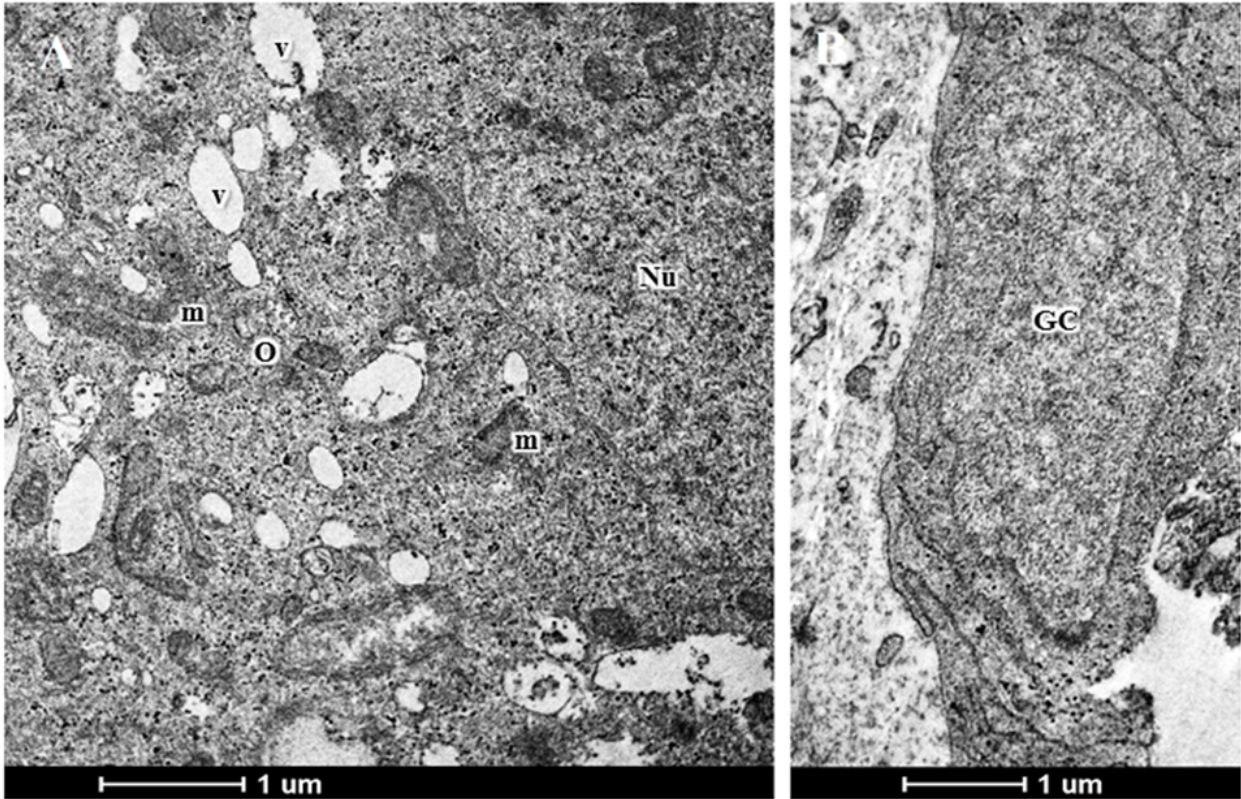
Symbols: O: oocyte; Nu: nucleus of oocyte; GC: granulosa cells; m: mitochondria; ser: smooth endoplasmic reticulum; v: vesicles

Fig. 17. Detail of an oocyte from uncultured tissue with nucleus and cytoplasmic organelles.



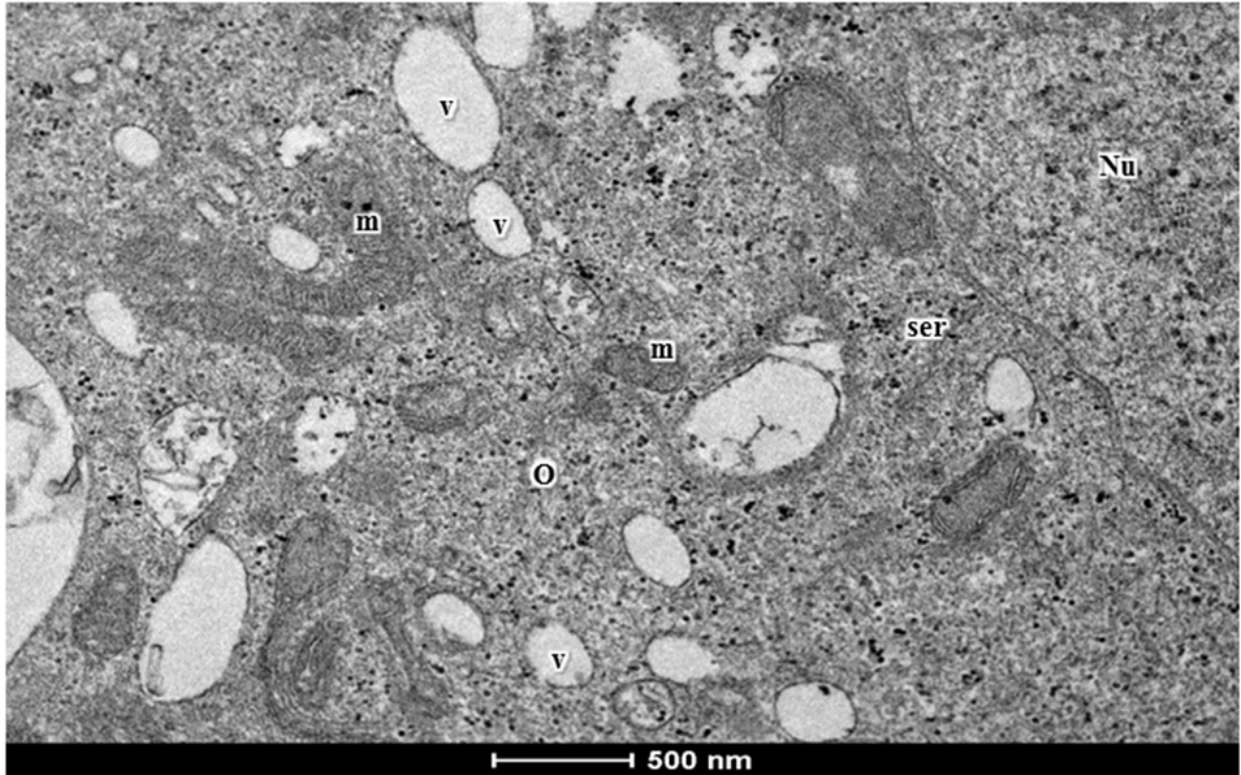
Symbols: O: oocyte; Nu: nucleus of oocyte; m: mitochondria; ser: smooth endoplasmic reticulum; v: vesicles

Fig. 18. Electron micrograph of a normal primordial follicle from cultured tissue in α -MEM⁺ only. A) oocyte; B) granulosa cell.



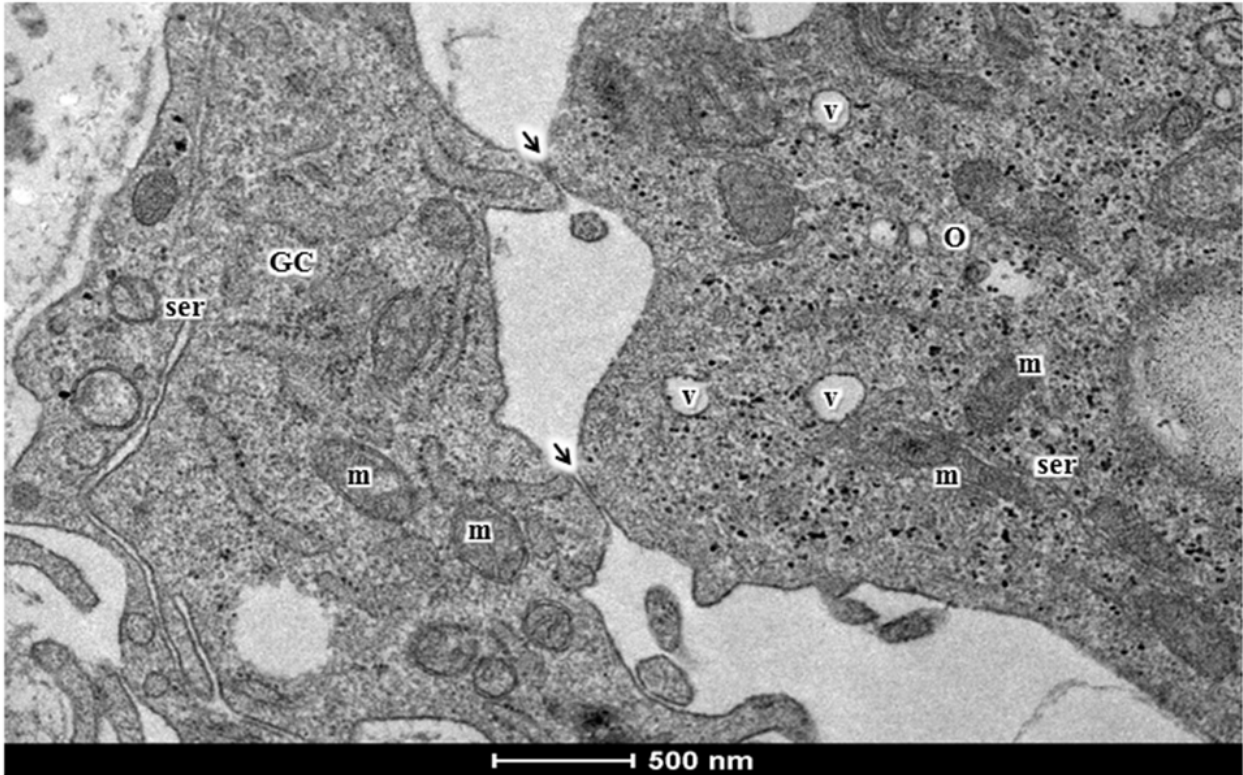
Symbols: O: oocyte; Nu: nucleus; m: mitochondria; v: vesicles.

Fig. 19. Detail of an oocyte from primordial follicle from cultured tissue in α -MEM⁺ only with nucleus and cytoplasmic organelles.



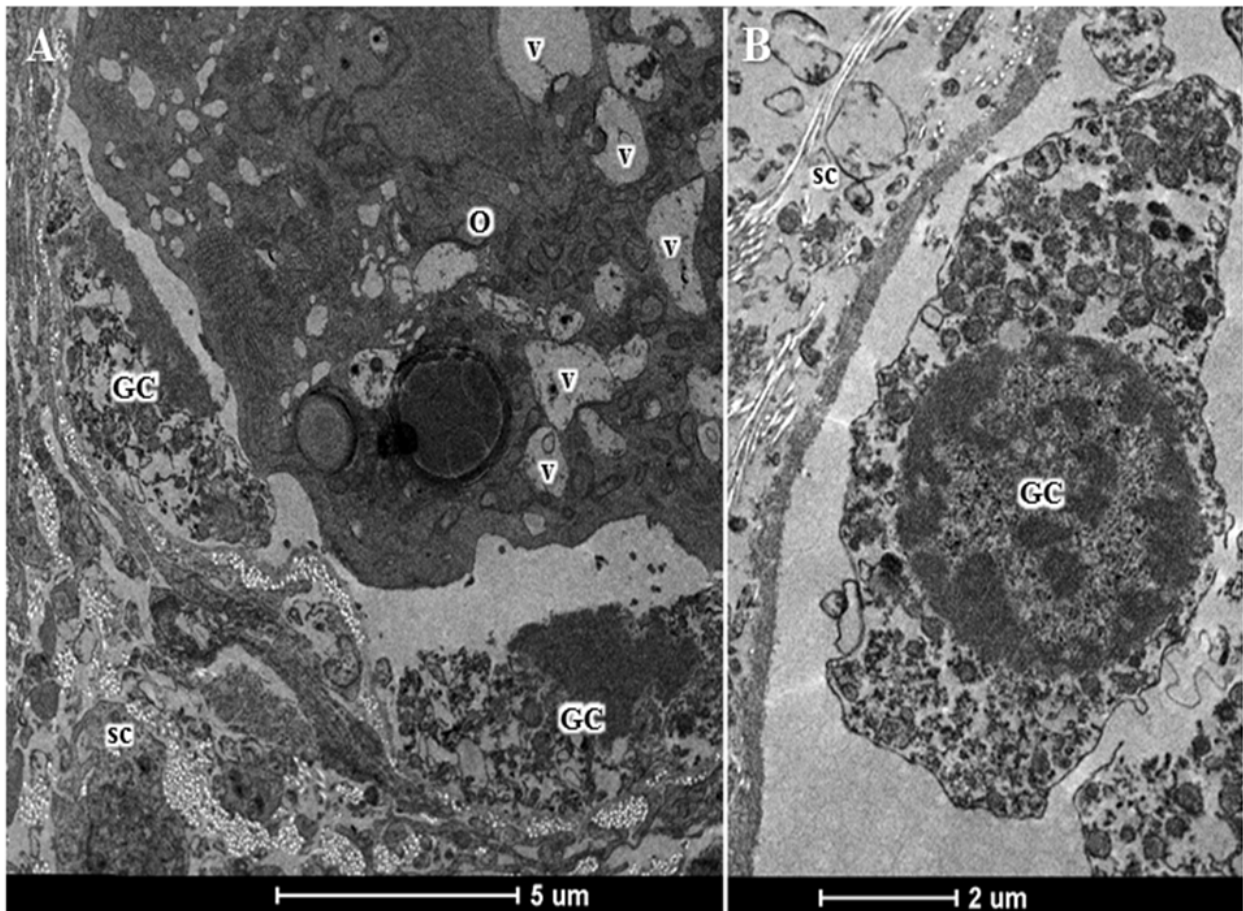
Symbols: O: oocyte; Nu: nucleus of oocyte; m: mitochondria; ser: smooth endoplasmic reticulum; v: vesicles

Fig. 20. Connections (arrows) between oocyte and granulosa from primordial follicles present in cultured tissue in α -MEM⁺ only.



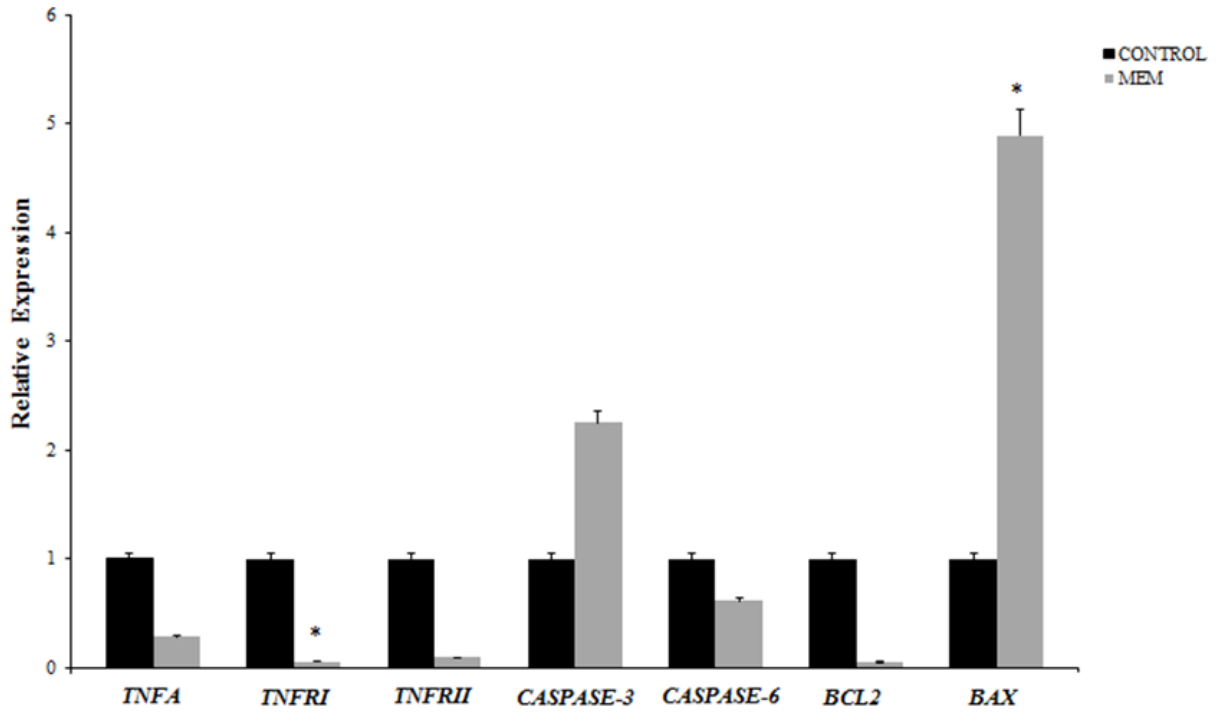
Symbols: m: mitochondria; ser: smooth endoplasmic reticulum; v: vesicles; O: oocyte; GC: granulosa cell.

Fig. 21. Electron micrograph of a degenerated primordial follicle from tissue cultured in presence of frutalin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A) Retracted oocyte and large irregularity of the follicular oocyte and its nuclear outlines; B) cytoplasmic low density of granulosa cells.



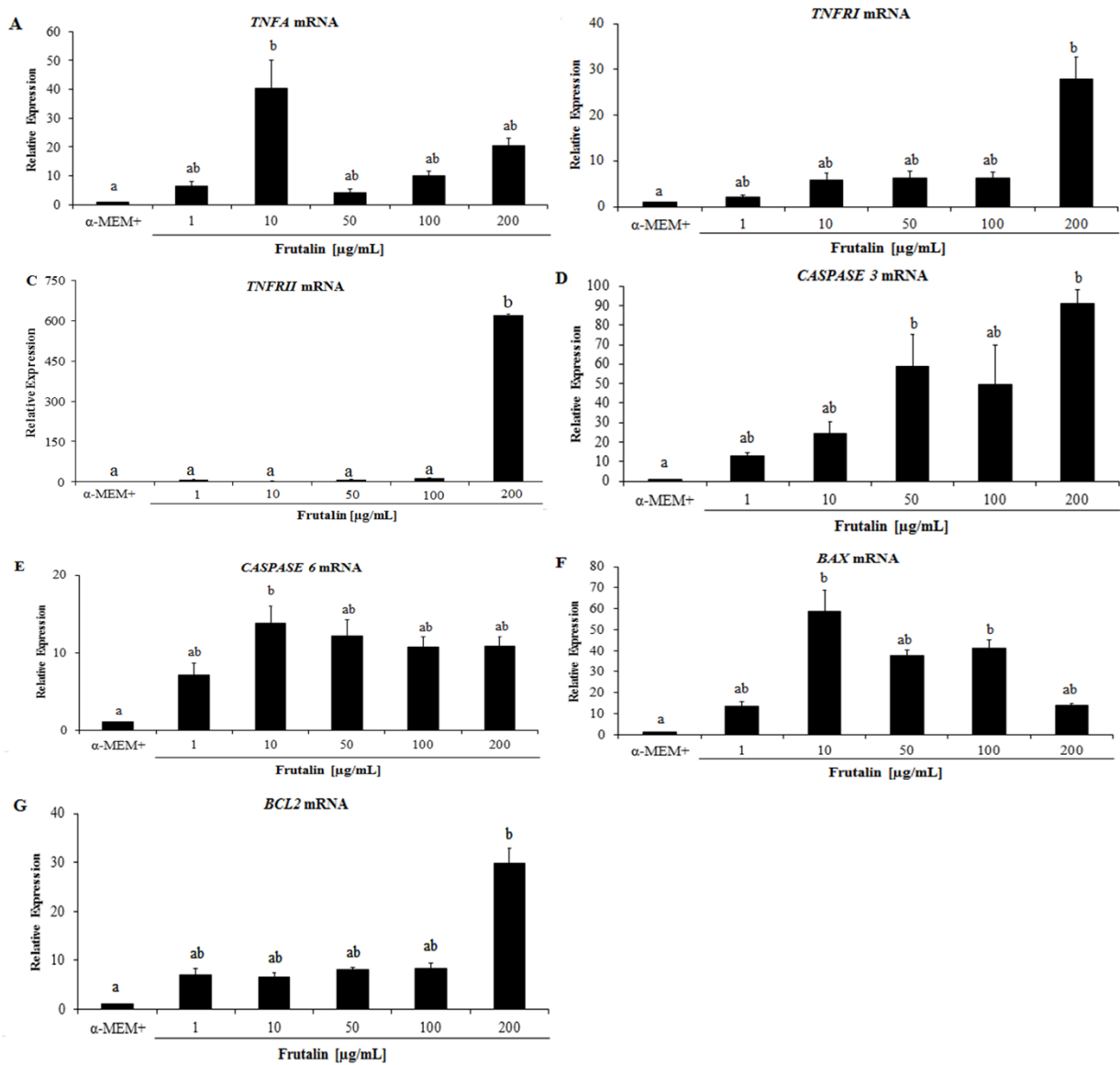
Symbols: O: oocyte; GC: granulosa cell; v: vesicles; sc: stromal cells.

Fig. 22. Levels of mRNA for *TNFA*, *TNFR1*, *TNFR2*, *CASPASE 3*, *CASPASE 6*, *BAX* and *BCL2* in tissues cultured in α -MEM+ when compared with fresh uncultured tissues.



Symbols: * Differs significantly from fresh control.

Fig. 23. Levels of mRNA for pro apoptotic genes in tissues cultured in α -MEM⁺ supplemented with frutalin. A) *TNF- α* ; B) *TNFR1*; C) *TNFR2*; D) *CASPASE 3*; E) *CASPASE 6*; F) *BAX*; G) *BCL2*.



Symbols: ^{a,b} Significant difference between treatments ($P < 0.05$).

7 FRUTALIN IS LESS TOXIC THAN DOXORUBICIN DURING THE CULTURE OF CAPRINE SECONDARY FOLLICLES *IN VITRO*

ABSTRACT

Doxorubicin is a well-known chemotherapeutic agent, while frutalin has antitumor properties. However, it is still unknown whether frutalin has lower toxic effects on preantral follicles than doxorubicin. This study was conducted to compare the effects of frutalin and doxorubicin on the survival and growth of *in-vitro* cultured goat secondary follicles, and on the expression of *Casp3*, *Casp6*, *Bax*, and *Bcl2* therein. Secondary follicles (~0.2 mm) were isolated from goat ovarian cortex and individually cultured at 39°C, with 5% CO₂ in air, for 6 days, in α -MEM⁺ alone (control medium), or in α -MEM⁺ supplemented with 0.3 μ g/mL doxorubicin, or with 0.6, 6.0 or 60.0 μ g/mL of frutalin. After culture, follicle viability, antrum formation, growth rate and follicular survival were evaluated. Additionally, the levels of mRNA for *Casp3*, *Casp6*, *Bax*, and *Bcl2* were investigated by real-time PCR. The results showed that, after 6 days of culture in medium supplemented with doxorubicin or frutalin (0.6, 6 and 60 μ g/mL), the percentage of normal follicles was significantly reduced, when compared to those of follicles cultured in control medium. Doxorubicin significantly reduced follicle viability, when compared to those cultured with frutalin at all concentrations tested. In addition, the percentage of normal follicles after culture with 0.6 and 6.0 μ g/mL of frutalin was significantly higher than those of follicles in presence of 60.0 μ g/mL frutalin. Except for follicles cultured with 0.6 μ g/mL frutalin, follicular growth rate was significantly reduced after culture in presence of doxorubicin or frutalin, when compared with control medium (α -MEM⁺). Around 60.0% of follicles cultured in control medium had antrum formation, but the presence of doxorubicin or frutalin significantly reduced

antrum formation ($P < 0.05$), the percentages ranging from 0.00 to 7.69%. The presence doxorubicin or 60.0 $\mu\text{g/mL}$ frutalin increased the level of RNAm for *Casp3*, *Casp6*, *Bax*, and *Bcl2* ($P < 0.05$), but higher levels of transcripts for *Casp3*, *Casp6* and *Bax* were found in follicles cultured with doxorubicin, when compared with those cultured with 60.0 $\mu\text{g/mL}$ frutalin. On the other hand, follicles cultured with frutalin had higher levels of mRNA for *Bcl2* ($P < 0.05$), when compared with those cultured in presence of frutalin. In conclusion, frutalin has lower toxic effects than doxorubicin on caprine secondary follicles cultured *in vitro*.

Keywords: Frutalin, doxorubicin, ovary, goat, secondary follicles, *in-vitro* culture, gene expression

Introduction

Lectins are proteins extensively used in biomedical applications with properties to recognize carbohydrates and glycoconjugates in cells, tissue sections, and biological fluids, being valuable tools in biotechnology, especially in the recognition of cancer-associated-oligosaccharides [1, 2]. Tumour cells display a wide range of glycosylation alterations compared with their non-transformed counterparts [3]. Frutalin, an α -D-galactose-specific carbohydrate-binding lectin, has received considerable attention in an attempt to develop alternative treatments for cancer diseases, because of its antitumor properties [4, 5, 6]. Previous *in-vitro* studies have shown that frutalin, at concentration of 60 $\mu\text{g/mL}$, can induce apoptosis and inhibits cell proliferation of HeLa cells [6]. However, it is well known that chemotherapy agents used for cancer treatment damage ovarian function and female fertility [7, 8]. For example, doxorubicin, which is widely used, at the concentration of 0.3 $\mu\text{g/mL}$ for the treatment of different cancers,

including sarcomas [9], ovarian [10] and breast tumors [11], has deleterious effects on female fertility even at low doses [12]. The adverse effects of this substance includes ovarian toxicity in mice by reducing ovulation rate and ovary size [13], as well as early menopause and increased infertility rate in women who maintain ovarian activity after chemotherapy [14]. In cancer cells, doxorubicin intercalates into DNA, and disrupts the action of topoisomerase-II-mediated DNA repair and promotes generation of free radicals and damages to cellular membranes, DNA and proteins [15]. Doxorubicin induces apoptosis or programmed cell death in mice ovarian follicles [13]. Apoptosis is regulated by balance between proapoptotic and antiapoptotic molecules, like *Bax* and *Bcl2*, respectively. Caspases are essential proteins in the process of apoptosis, caspase 3 and 6 both acting as effectors [16, 17, 18].

Considering that frutalin is capable of inducing apoptosis in cancer cells [6], it is very important to evaluate the effects of this lectin on preantral follicles, i.e., primordial, primary and secondary follicles, since they form a far larger oocyte reservoir (~90% of the follicular population) than antral follicles. Recently, an *in-vitro* study showed that frutalin did not influence caprine primordial follicle activation, but reduced follicular survival, increased mRNA expression of pro-apoptotic genes and induced changes in the structural characteristics of primordial follicles that were cultured within ovarian tissue fragments [19]. Despite of doxorubicin and frutalin have recently seen to evoke degeneration of rat [13] and goat early-staged follicles [19], it is still unknown whether frutalin has different, perhaps lower toxic effects on preantral follicles than doxorubicin.

The aim of the current study is to investigate and to compare the effects of frutalin and doxorubicin on *in-vitro* survival and growth of 6-days cultured goat secondary follicles, and on mRNA expression of *Casp3*, *Casp6*, *Bax*, and *Bcl2* therein.

Materials and methods

Chemicals

Unless mentioned otherwise, the culture media and other chemicals used in the present study were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO).

Isolation and purification of frutalin

Mature seeds from *Artocarpus incisa* L. were cut into small fragments, dried in acetone (P.A) and ground into a fine powder. The powder was incubated at a 1:10 ratio (w/v) in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) at room temperature with continuous stirring for 2 h before centrifugation at 10 000 x *g* for 20 min at 5 °C. The supernatant (crude extract) was precipitated with ammonium sulfate (0-90% of saturation, F_{0/90}) and centrifuged at 12 000 x *g* for 30 min at 5 °C. The pellet was suspended and dialyzed in PBS pH 7.4. The protein solution (F_{0/90}) was applied to an agarose–D-galactose column (8 x 1 cm) equilibrated with the same buffer. After removing the unbound material, frutalin was eluted with 100 mM D-galactose in an equilibrium solution. The presence and purity of the lectin in the pooled fractions were checked by SDS-PAGE 15%. Fractions containing pure frutalin were dialyzed against PBS pH 7.4 and concentrated in 10 KDa Amicon® (Millipore) tubes [20].

Source of ovaries

Goat ovaries (*Capra hircus*) (n=50) were collected, from a slaughterhouse and washed in 70% alcohol for approximately 10 s and then twice in rinsed in saline (0.9% NaCl) containing 100IU mL⁻¹ penicillin and 100µg mL⁻¹ streptomycin and kept at 4°C, in a thermal container and transported to the laboratory within 1h (goat: [21]).

Isolation, selection and culture of secondary follicles

In the laboratory, ovarian cortical slices (1 to 2mm in diameter) were cut from the ovarian surface, using a surgical blade. The ovarian cortex was subsequently placed in fragmentation medium, consisting of minimum essential medium (MEM) plus HEPES. Secondary follicles of approximately 200µm in diameter were visualized under a stereo microscope (SMZ 645 Nikon, Tokyo, Japan) and manually dissected from strips of ovarian cortex, using 26 gauge (26G) needles. After isolation, follicles were transferred to 100µL drops containing fresh medium under mineral oil to further evaluation of the follicular quality. Follicles with a visible oocyte, surrounded by granulosa cells, an intact basement membrane and no antral cavity were selected for culture.

For *in vitro* studies, follicles were cultured individually in 100 µL drops of culture medium in petri dishes (60x15mm, Corning, USA). Isolated secondary follicles were randomly cultured in α -MEM⁺ (control medium) alone or supplemented with 0.3 µg/mL doxorubicin, and 0.6, 6.0 or 60.0 µg/mL frutalin. Concentrations of doxorubicin and frutalin were chosen according to results of previous studies (6, 9-11). The culture was replicated four times, and around 40 follicles were used in each treatment. The control medium consisted in α -MEM supplemented with 3 mg/mL bovine serum albumin (BSA), 10ng/mL insulin, 5.5 µg/mL

transferrin and 5 ng/mL selenium, 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine, 50 µg/mL ascorbic acid and 100 ng/mL FSH (α -MEM⁺). The culture was carried out at 39 °C, in 5% CO₂ in air for 6 days. Fresh media were prepared and pre-equilibrated for 2 h prior to use. Every other day, 60 µL of medium were replaced in each drop. After culture, follicle growth, antrum formation and the percentages of morphologically normal follicles were evaluated. In addition, some follicles were stained to evaluate their viability by fluorescence microscopy or stored at -80 °C for PCR.

Morphological evaluation of cultured follicles

Follicles were morphologically evaluated with stereomicroscope (SMZ 645 Nikon, Tokyo, Japan), and morphologically normal follicles had a spherical oocyte surrounded by cumulus cells, which was limited by an intact basement membrane and a stromal-thecal outer layer, respectively. Follicles with an opaque and/or extruded oocyte and opaque granulosa cells were considered degenerated. In addition, two perpendicular measurements were performed in the normal follicles using an inverted microscope with NIS Elements 2.4 software (Nikon, Nikon Instruments Inc., Americas).

Assessment of preantral follicle viability by fluorescence microscopy

The viability of follicles cultured in all treatments were further analyzed using a more accurate method of assessment based on fluorescent probes. After culture, follicles were incubated in 100µL droplets of α -MEM⁺ containing 4 mM calcein-AM and 2 mM ethidium homodimer-1 (Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe, Germany) at 37°C for 15 min. Then, the follicles were washed three times in α -MEM⁺ and examined under fluorescence microscope

(Nikon, Eclipse, TS 100). Oocytes and granulosa cells were considered to be viable when the cytoplasm was stained positively with calcein-AM (green) and when the chromatin was not labeled with ethidium homodimer-1 (red) [22, 23].

Quantification of mRNA for Casp3, Casp6, Bax, and Bcl2 in cultured follicles

From four samples of follicles cultured in each treatment, total RNA extraction was performed using a Trizol purification kit (Invitrogen, São Paulo, SP, Brazil). In accordance with the manufacturer's instructions, 800 μ L of Trizol solution was added to each frozen sample, and the lysate was aspirated through a 20-gauge needle before centrifugation at 10,000 g for 3 min at room temperature. Thereafter, all lysates were diluted 1:1 with 70% ethanol and subjected to a minicolumn. After binding of the RNA to the column, DNA digestion was performed using RNase free DNase (340 Kunitz units/mL) for 15 min at room temperature. After washing the column three times, RNA was eluted with 30 mL RNase-free water. The RNA concentration was estimated by reading the absorbance at 260 nm and was checked for purity at 280 nm in a spectrophotometer (Amersham Biosciences, Cambridge, UK). Before the reverse transcription reaction, samples of RNA were incubated for 5 min at 70°C and then cooled on ice. From 2 mg of total mRNA, reverse transcription was performed in a total volume of 20 mL, which was composed of 10 mL of sample RNA, 4 mL 5X reverse transcriptase buffer (Invitrogen), 8 U RNaseout, 150 U Superscript III reverse transcriptase, 0.036 U random primers (Invitrogen), 10 mM dithiothreitol, and 0.5 mM of each deoxyribonucleotide triphosphates. The mixture was incubated for 1 h at 42°C, for 5 min at 80°C, and then stored at -20°C. Negative controls were similarly prepared but without inclusion of reverse transcriptase.

Quantification of mRNA was performed using SYBR Green. The PCR reactions were composed of 1 μ L cDNA as a template in 7.5 μ L of SYBR Green Master Mix (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 5.5 μ L of ultrapure water, and 5 mM of each primer. The primers were designed to amplify mRNA for *Casp3*, *Casp6*, *Bax*, and *Bcl2* and *B-actin* (housekeeping gene) (Table 1). The specificity of each primer pair was confirmed by melting curve analysis of the PCR products. The thermal cycling profile for the first round of PCR was as follows: initial denaturation and activation of the polymerase for 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C, 30 s at 58°C, and 30 s at 72°C. The final extension was for 10 min at 72°C. Primer efficiency was determined using serial dilutions of the target cDNA. All reactions were performed in triplicate in StepOnePlus™ Real Time System (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Reactions without cDNA were performed in parallel as negative controls. The delta-delta-Ct method was used to transform the Ct values into normalized relative expression levels. The data were calculated from three independent replicates.

Statistical analysis

Data of follicular diameter were subjected to logarithmic transformation ($\log_{10}(x)$) and then, evaluated by ANOVA. The treatments were compared by Student-Newman-Keuls (SNK) test. Results were expressed as mean \pm standard error of the mean (S.E.M) and differences were considered significant when $P < 0.05$. Data concerning follicular survival and antrum formation after *in-vitro* culture in each treatment were compared by using the Chi-square test, with the results being expressed as percentages. The data of mRNA were analyzed using the Tukey test. Differences were considered significant when $P < 0.05$ and data were expressed as mean \pm standard error of means (S.E.M.)

Results

Effect of different concentrations of frutalin on follicular growth, antrum formation and survival

A total of 208 secondary follicles were cultured *in vitro* in different treatments. After 6 days of culture, presence of doxorubicin or frutalin in culture medium significantly reduced the percentage of morphologically normal follicles, when compared with control medium (Table 2). Additionally, doxorubicin in culture medium resulted in a lower percentage of morphologically normal follicles, when compared with the percentages of follicles that were cultured in presence of frutalin, even at the highest concentration of 60.0 µg/mL ($P < 0.05$). Furthermore, the percentage of normal follicles after culture in medium supplemented with 0.6 and 6 µg/mL of frutalin were significantly higher than those seen in follicles cultured with 60.0 µg/mL frutalin (Table 2).

The fluorescence microscopy assessment using calcein-AM labeling confirmed the results obtained by morphological evaluation. All follicles considered to be morphologically normal after light microscopical analysis were positive for calcein-AM but not ethidium homodimer-1, which means that they were all viable (Figure 24). Around 60.0% of follicles cultured in control medium had antrum formation, but the presence of doxorubicin or frutalin in culture medium significantly reduced antrum formation ($P < 0.05$), the percentages ranging 0.00 to 7.69% (Table 2).

Follicular diameters after 6 days of *in vitro* culture are shown in Table 3. Follicles cultured for 6 days increased their diameters after all treatments, except those cultured in presence of doxorubicin. Follicles cultured in medium containing doxorubicin had significantly

reduced diameters, when compared with those cultured in control medium or those supplemented with frutalin.

Effect of frutalin and doxorubicin on mRNA expression of Casp3, Casp6, Bax, and Bcl2 in cultured secondary follicles

The presence of either doxorubicin or frutalin [60 µg/mL] in culture medium significantly increased the levels of mRNA for *Casp3*, *Casp6*, *Bax*, and *Bcl2*, when compared with control medium. Follicles cultured for 6 days in medium supplemented with frutalin had significantly lower levels of mRNA for pro-apoptotic genes (*Casp3*, *Casp6* and *Bax*), when compared with follicles cultured in presence of doxorubicin. The mRNA level for *Bcl2* (anti-apoptotic gene) was significantly higher in follicles cultured in medium supplemented with frutalin than in follicles cultured in presence of doxorubicin (Figure 25).

Discussion

The present study demonstrated as first that frutalin has lower toxic effects than doxorubicin on goat secondary follicles. This finding opens new possibilities for the use of this lectin, in view of its toxic effects on various types of cancer cells [5, 6] Previous studies demonstrated that frutalin induced alterations in morphology and reduced the number of HeLa cells *in vitro* [6]. On the other hand, Brando-Lima et al. [4] reported frutalin is a potent mitogenic activator of healthy cells, like human lymphocytes, through the PI3K/Akt pathway. Regarding the effects of other lectins on ovarian follicles, it was previously reported that phytohemagglutinin (PHA) stimulates antrum formation, helps to keep ultrastructure integrity and increases the

expression of *FSHR* and proliferating cell nuclear antigen (*PCNA*) in caprine preantral follicles cultured *in vitro* [24]. Association of the lectin jacalin and FSH promoted primordial follicle activation after 6 days of culture [25]. Additionally, Portela et al. [26] demonstrated that concanavalin A (Con A) were effective in maintaining the percentage of normal follicles and in promoting primordial follicle activation, in goats, after 6 days of culture. In contrast, Velasquez et al. [27] indicated that Con A reduces follicular viability in culture of rat follicles. Besides that, Con A may also induce granulosa cell death and follicle atresia [27]. Despite doxorubicin exhibit cytotoxicity on various types of cancer, such as, cervical cancer [28], endometrial cancer [29], breast cancer [30] and uterine cancers [31], it also induces apoptosis and necrosis in healthy tissue causing toxicity in the brain, liver, kidney and heart [32]. Recently, an *in-vitro* study showed that doxorubicin reduces the number of caprine morphologically normal preantral follicles [33], which is in accordance with our present results.

Despite frutalin and doxorubicin increase mRNA levels for the anti-and pro-apoptotic genes, caprine secondary follicles cultured in presence of frutalin had reduced levels of mRNA for pro-apoptotic genes (*Bax*, *Casp3* and *Casp 6*) and increased for gene anti-apoptotic (*Bcl2*), when compared to those cultured in doxorubicin. Apoptosis is regulated by balance between the genes promoting and those inhibiting apoptosis, inducing or accelerating apoptosis. The Bax protein exerts an important effect in the regulation of cell apoptosis, while *Bcl2* is the key cell apoptosis inhibitory protein [34]. Variations in the expression of *Bax* alter the balance between the promoting and inhibiting apoptosis genes. For example, high Bax expression levels and formation of homo- or heterodimers with *Bcl2* may lead to cell death [35, 36]. In this way, Bcl-2/Bax ratio is also considered a key factor for cell survival [34]. When the Bcl-2/Bax ratio increases, cell apoptosis is inhibited and when the ratio is decreased, apoptosis is promoted [34].

Caspases, such as 3 and 6, are normally found in cytoplasm as inactive proenzymes and, when activated, promote proteolytic disintegration of cells [37, 38].

Pani et al. [39] indicated that there are evidences to suggest mitogenic and death-promoting effects induced by lectins. More recently, we have demonstrated that the presence of frutalin increased the mRNA expression of *TNF- α* , *TNFR1*, *TNFR2*, *Casp3*, *Casp6*, *Bax* and *Bcl2* in goat ovarian follicles in [19]. The literature suggests that lectins, such as frutalin and Con A, possess proapoptotic, proautophagic, and antiangiogenic properties in cancer cell lines [6, 27, 40, 41]. In lymphocytes, frutalin and jacalin stimulate the expression of *IL-2* and *IL-2R*, which can serve as a growth and differentiation factor to regulate cell death [4, 42, 43, 44]. Oliveira et al. [6] indicated that frutalin increased the rate of cellular apoptosis in HeLa cells. *Agrocybe aegerita* lectin, an α -D-galactose-binding protein, is translocated into the HeLa cell nucleus and induce cell apoptosis [45].

In conclusion, frutalin has lower toxic effects than doxorubicin on caprine secondary follicles cultured *in vitro*. Compared with doxorubicin, frutalin increases the expression of *Bcl2* (anti-apoptotic gene), while its effects on expression of pro-apoptotic genes (*Casp3*, *Casp6* and *Bax*) is less intense than doxorubicin.

Acknowledgments

This research was supported by grants from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil, grant number 407153/2013-6).

References

- [1] Santos AFS, Napoleão TH, Bezerra RF, Carvalho EVMM, Correia MTS, Paiva PMG, et al. Strategies to obtain lectins from distinct sources. In: Leon V. Berhardt, *Advances in Medicine and Biology*, New York: Nova Publishers Inc; v. 63, p. 33-60, 2013. ISBN: 978-1-62417-922-8.
- [2] Silva LCN, Filho CMB, Paula RA, Coelho LCBB, Silva MV, Correia MTDS. *Cratylia mollis* lectin: a versatile tool for biomedical studies. *Curr Bioact Compd* 2014;10(1):44-54.
- [3] Salomé S, Pinho SS, Reis CA. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat. Rev. Cancer* 2015;15:540-55.
- [4] Brando-Lima AC, Saldanha-Gama RF, Henriques MD, Monteiro-Moreira AC, Moreira RA, Barja-Fidalgo C. Frutalin, a galactose-binding lectin, induces chemotaxis and rearrangement of actin cytoskeleton in human neutrophils: involvement of tyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;15(208):145-54.
- [5] Oliveira C, Texeira JA, Schmitt F, Domingues L. A comparative study of recombinant and native frutalin binding to human prostate tissues. *BMC Biotechnol* 2009;9:78.
- [6] Oliveira C, Nicolau A, Texeira JA, Domingues L. Cytotoxic effects of native and recombinant frutalin, a plant galactose-binding lectin, on HeLa cervical cancer cells. *J. Biomed Biotechnol* 2011; 2011.
- [7] Morgan S, Anderson RA, GGourley C, Wallace WH, Spears N. How do chemotherapeutic agents damage the ovary? *Hum Reprod* 2012;18(5):525–35.
- [8] De Vos M, Smits J, Woodruff K. Fertility preservation in women with cancer. *Lancet* 2014; 384(9950):1302–10.
- [9] Maruzzo M, Rastrelli M, Lumachi F, Zagonel V, Basso U. Adjuvant and neoadjuvant chemotherapy for soft tissue sarcomas. *Curr Med Chem* 2013;20:1-8.
- [10] Morgan Jr RJ, Armstrong DK, Alvarez RD, Bakkum-Gamez JN, Behbakht K, Chen L, et al. Ovarian cancer, version 1.2016, Clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 2016; 14(9): 1134-164.
- [11] National Clinical Effectiveness Committee (NCEC). Department of Health. Diagnosis, staging and treatment of patients with breast cancer. National Clinical Guideline. n. 7. 2015. ISSN 2009-6259.
- [12] Nishi K, Gunasekaran VP, Arunachalam J, Ganeshan M. Doxorubicin-induced female reproductive toxicity: an assessment of ovarian follicular apoptosis, cyclicity and reproductive tissue histology in Wistar rats. *Drug Chem Toxicol* 2017;25:1-10.

- [13] Ben-Aharon I, Bar-Joseph H, Tzarfaty G, Kuchinsky L, Rizel S, Stemmer SM, et al. Doxorubicin-induced ovarian toxicity. *Reprod Biol Endocrinol* 2010;4:8-20.
- [14] Letourneau JM, Ebbel EE, Katz PP, Oktay KH, McCulloch CE, Ai WZ, et al. Acute ovarian failure underestimates age-specific reproductive impairment for young women undergoing chemotherapy for cancer. *Cancer* 2012;118:1933-39.
- [15] Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 1999;57:727-41.
- [16] Kaipia A, Hsueh AJ. Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu Rev Physiol* 1997;59:349-63.
- [17] Hussein MR. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum Reprod Update* 2005;11(2):162-77.
- [18] Matsuda F, Inoue N, Manabe N, Ohkura S. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. *J Reprod Dev* 2012;58:44-50.
- [19] Soares MA, Costa JJ, Vasconcelos GL, Ribeiro RP, Souza JC, Silva AL, et al. Effects of frutalin on early follicle morphology, ultrastructure and gene expression in cultured goat ovarian cortical tissue. *Histol Histopathol* 2017;15:11882.
- [20] Moreira RA, Castelo-Branco CC, Monteiro AC, Tavares RO, Beltramini LM. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. *Phytochemistry* 1998;47:1183-88.
- [21] Chaves RN, Martins FS, Saraiva MVA, Celestino JJH, Lopes CAP, Correia JC, et al. Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured *in vitro*. *Reprod Fertil Dev* 2008;20:640-47.
- [22] Schotanus K, Holtkamp GM, Van Rooijen N, Tilders FJ, Berkenbosch F. Circulating tumor necrosis factor-alpha does not mediate endotoxin-induced hypothermia in rats *American J Physiol* 1995;268:989-96.
- [23] Van Den Hurk R, Spek ER, Hage WJ, Fair T, Ralph JH, Schotanus K. Ultrastructure and viability of isolated bovine preantral follicles. *Hum Reprod Update* 1998;4(6):833-41.
- [24] Cunha EV, Costa JJN, Rossi RODS, Silva AWB, Passos JRS, Portela AMLR, et al. Phytohemagglutinin improves the development and ultrastructure of *in vitro*-cultured goat (*Capra hircus*) preantral follicles. *Braz J Med Biol Res* 2013;46(3):245-52.
- [25] Ribeiro RP, Portela AMLR, Silva AWB, Costa JJN, Passos JRS, Cunha EV, et al. Effects of jacalin and follicle-stimulating hormone on *in vitro* goat primordial follicle activation, survival and gene expression. *Zygote* 2015;23:537-49.

- [26] Portela AMLR, Ribeiro RP, Costa JJN, Rossi RODS, Passos JRS, Vasconcelos GL, et al. Effects of different concentrations of concanavalin A and follicle stimulating hormone on goat primordial follicles activation, survival and gene expression. *Small Rumin Res* 2014;116: 183-91.
- [27] Velasquez EV, Ríos M, Ortiz ME, Lizama C, Nuñez E, Abramovich D, et al.. Concanavalin-A induces granulosa cell death and inhibits FSH-mediated follicular growth and ovarian maturation in female rats. *Endocrinology* 2013;154(5):1885–96.
- [28] Lal S, Mahajan A, Chen WN, Chowbay B. Pharmacogenetics of target genes across doxorubicin disposition pathways: a review. *Curr Drug Metab* 2010;11:115–28.
- [29] Gigli M, Rasoanaivo TW, Millot JM, Jeannesson P, Rizzo V, Jardillier JC, et al. Correlation between growth inhibition and intranuclear doxorubicin and 4'-deoxy-4'-iododoxorubicin quantitated in living K562 cells by microspectrofluorometry. *Cancer Res* 1989; 49:560–64.
- [30] Ashley N, Poulton J. Mitochondrial DNA is a direct target of anticancer anthracycline drugs. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;378:431–47.
- [31] Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, Correia S, Oliveira PJ, Santos MS, et al. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem* 2009;16:3267–85.
- [32] Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol* 2013;65:157–70.
- [33] Leiva-Revilla J, Lima LF, Castro SV, Campello CC, Araújo VR, Celestino JJ, et al. Fraction of *Auxemma oncocalyx* and *Oncocalyxone A* affects the *in vitro* survival and development of caprine preantral follicles enclosed in ovarian cortical tissue. *Forsch Komplementmed* 2016;23(5):307-13.
- [34] Liu G, Wang T, Wang T, Song J, Zhou Z. Effects of apoptosis-related proteins caspase-3, Bax and Bcl-2 on cerebral ischemia rats. *Biomed Rep* 2013;1(6): 861-67.
- [35] Haddad JJ. The role of Bax/Bcl-2 and pro-caspase peptides in hypoxia/reperfusion-dependent regulation of MAPK (ERK): discordant proteomic effect of MAPK (p38) Protein Pept Lett 2007;14:361-71.
- [36] Qin AP, Zhang HL, Qin ZH. Mechanisms of lysosomal proteases participating in cerebral ischemia-induced neuronal death. *Neurosci Bull* 2008;24:117-23.
- [37] Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med* 1999;107(5):489-06.
- [38] Onal M, Ovet G, Onal O. Review of Apoptosis. *MOJ Immunol* 2016;3(1):73-6.

- [39] Pani G, Colaviti R, Borrelo S, Galeotti T. Endogenous oxygen radicals modulate protein tyrosine phosphorylation and JNK-1 activation in lectin-stimulated thymocytes. *Biochem J* 2000;347:173-81.
- [40] Li WW, Yu JY, Xu HL, Bao JK. Concanavalin A: a potential antineoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;414:282-286.
- [41] Fu LL, Zhou CC, Yao S, Yu JY, Liu B, Bao JK. Plant lectins: targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. *Int J Biochem Cell Biol* 2011;43:1442-49.
- [42] Lafont V, Hivroz C, Carayon P, Dornand J, Favero J. The lectin jacalin specifically triggers cell signaling in CD4+ T lymphocytes. *Cell Immunol* 1997;181:23-9.
- [43] Kabir S. Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research. *J Immunol Methods* 1998;212:193-11.
- [44] Tamma SM, Kalyanaraman VS, Pahwa S, Dominguez P, Modesto RR. The lectin jacalin induces phosphorylation of ERK and JNK in CD4+ T cells. *J Leukoc Biol* 2003;73:682-88.
- [45] Liang Y, Feng L, Tong X, Wang K, Li de F, Lin JC, et al. Importance of nuclear localization for the apoptosis-induced activity of a fungal galectin AAL (*Agrocybe aegerita* lectin). *Biochem Biophys Res Commun* 2009;386(3):437-42.

Figures and tables

Table 4 Primer pairs used in real-time PCR

Target gene	Primer sequence (5'→3')	Sense (s) anti-sense(s)	Position	GenBank accession no.
<i>CASP3</i>	CACGGAAGCAAATCAGTGGAC CGACAGGCCATGCCAGTATT	S as	73-93 181-200	GI: 379067369
<i>CASP6</i>	ACTCCGTGGCAGAAGGTTATTA TGAGAAACCTTCCTGTTCACCA	S as	589-610 712-733	GI: 548469419
<i>BAX</i>	GCCCTTTTCTACTTTGCCAGC GGCCGTCCCAACCACCC	S as	334-354 465-481	GI: 41386763
<i>BCL2</i>	GGTAGGTGCTCGTCTGGATG GGCCACACACGTGGTTTTAC	S as	2317-2336 2421-2440	GI: 22652876
<i>B-ACTIN</i>	ACCACTGGCATTGTCATGGACTCT TCCTTGATGTCACGGACGATTTCC	S as	187-211 386-410	GI: 28628620

Table 5. Percentage of morphologically normal secondary follicles, and antrum formation after *in-vitro* culture for 6 days in α -MEM⁺ alone or supplemented with doxorubicin or different concentrations of frutalin (0.6, 6.0 and 60.0 μ g/mL)

Treatments (n)	% Morphologically normal follicles	% Antrum formation
α -MEM ⁺ (n=46)	95.65 (44/46) A	58.69 (27/46) A
Doxorubicin (n=42)	16.66 (7/42) B	0.00 (0/42) B
Frutalin [0.6 μ g/mL] (n=39)	74.35 (29/39) C	7.69 (3/39) B
Frutalin [6.0 μ g/mL] (n=38)	71.05 (27/38) C	5.26 (2/38) B
Frutalin [60.0 μ g/mL] (n=43)	46.51 (20/43) D	0.00 (0/43) B

A, B, C, D Distinct capital letters represent significant differences among experimental treatments ($P < 0.05$).

n=Total number of analyzed follicles per treatment

Table 6. Follicular diameter (on day 0 and 6) of isolated secondary follicles after *in-vitro* culture in α -MEM+ or supplemented with, doxorubicin or different concentrations of frutalin (0.6, 6.0 and 60.0 $\mu\text{g/mL}$).

Treatments	D0	D6
α -MEM ⁺	200.55 \pm 4.21 Ab	232.40 \pm 5.51 Aa
Doxorubicin	196.65 \pm 5.08 Aa	203.85 \pm 5.48 Ba
Frutalin [0.6 $\mu\text{g/mL}$]	196.99 \pm 4.26 Ab	219.79 \pm 6.09 Aa
Frutalin [6.0 $\mu\text{g/mL}$]	198.01 \pm 4.85 Ab	212.23 \pm 6.75 Aa
Frutalin [60.0 $\mu\text{g/mL}$]	200.30 \pm 4.45 Ab	210.57 \pm 4.74 Aa

A,B Distinct capital letters represent significant differences among treatments within the same day of culture. a,b Different lowercase letters represent significant differences between days of culture within the same treatment. (P < 0.05).

Figure 24. Viable goat secondary follicles cultured for 6 days evaluated by light microscopy (100x magnification) and after staining with calcein-AM (green) and ethidium homodimer-1 (red). Secondary follicle cultured in α -MEM⁺ alone (A, B) or supplemented with doxorubicin (C, D) or frutalin at concentrations of 0.6 (E, F) 6.0 (G, H) and 60.0 μ g/mL(I, J). Scale bars represent 100 μ m.

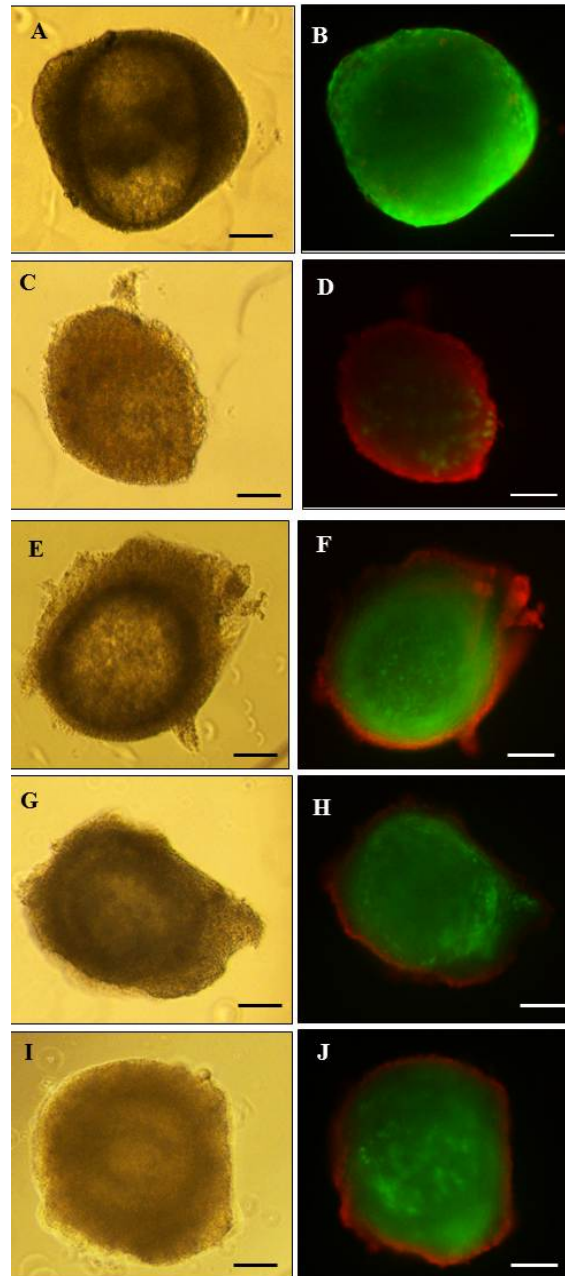
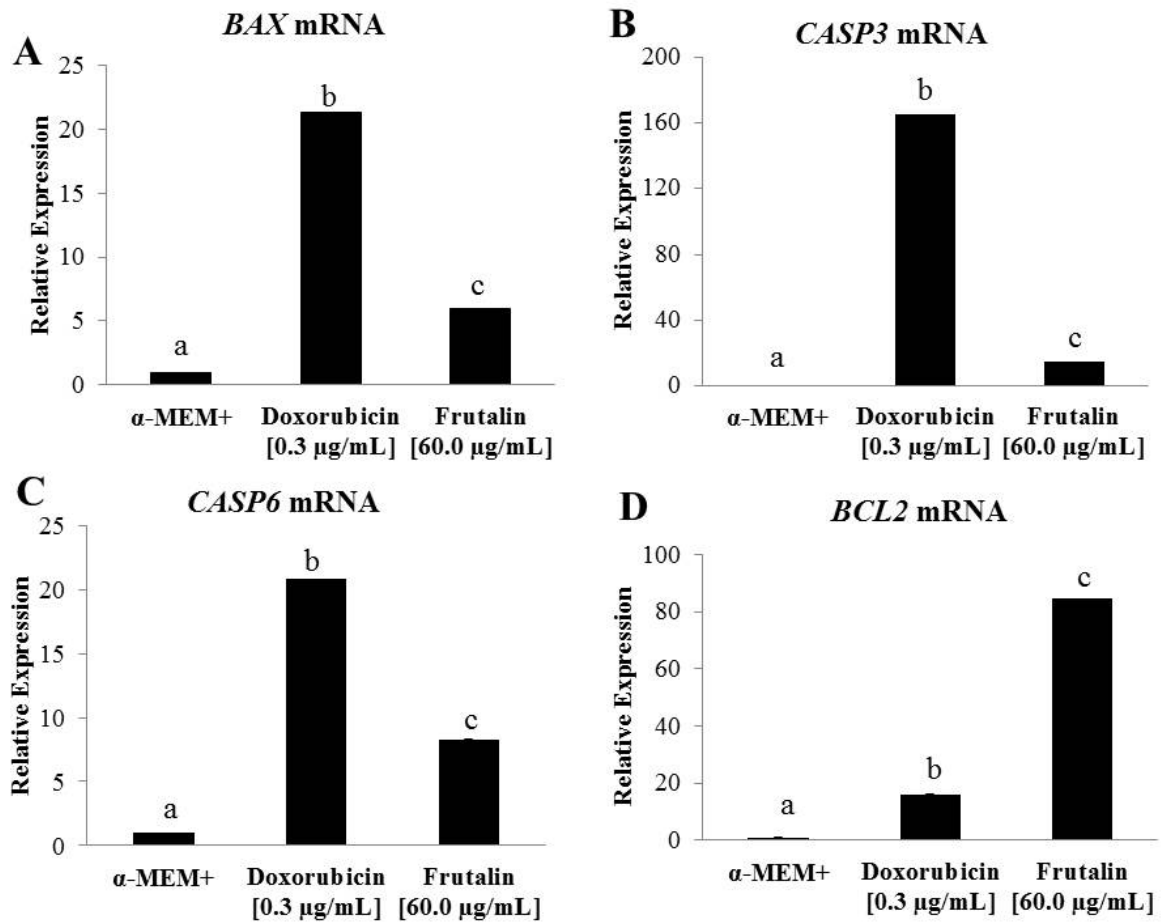


Figure 25. Levels of mRNA for *BAX*(A); *CASP3*(B), *CASP6*(C) and *BCL2*(D) in secondary follicles (mean \pm SD) cultured *in vitro* for 6 days. ^{a,b,c} Significant difference between treatments ($P < 0.05$).



8 CONCLUSÕES

- A frutalina não influencia a ativação dos folículos primordiais caprinos *in vitro* e, em baixas concentrações (1 e 10 µg/mL), mantém uma elevada percentagem de folículos saudáveis (> 60%).
- Apesar da ausência de um efeito dose-resposta na expressão de genes pró- e anti-apoptóticos, a frutalina aumenta a expressão de RNAm de genes pró-apoptóticos (*TNF-α*, *TNFR1*, *TNFR2*, *CASP3*, *CASP6* e *BAX*).
- A frutalina é menos tóxica do que a doxorrubicina durante o cultivo de folículos secundários caprinos *in vitro*.
- Em comparação com a doxorrubicina, a frutalina aumenta a expressão de *BCL2* (gene anti-apoptótico) e reduz a expressão de genes pró-apoptóticos (*CASP3*, *CASP6* e *BAX*) durante o cultivo de folículos secundários caprinos *in vitro*.

9 PERSPECTIVAS

O presente estudo demonstrou que o tecido ovariano caprino após seis dias de cultivo em meio contendo frutalina apresenta cerca de 60% de folículos primordiais normais e que esta lectina não influencia na ativação dos folículos primordiais. Além disso, a redução na citotoxicidade da frutalina em relação à doxorrubicina sobre a foliculogênese abre novas perspectivas para o emprego da referida substância no tratamento de câncer em mulheres. No entanto, mais testes utilizando novas concentrações de frutalina, distintos intervalos de tempo e células de diferentes linhagens cancerígenas são necessários para um melhor entendimento da atuação desta substância e seus efeitos sobre a reprodução.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; KUMAR, V.; COTRAN, R. S.; ASTER, J. C.; ROBBINS, S.; L. Robbins e Cotran: **Patologia - Bases patológicas das doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010, 1458 p.
- ABDEL-GHANI, M. A.; EL-SHERRY, T. M.; ABDELHAFEEZ, H. H. Effect of growth differentiation factor-9 (GDF-9) on the progression of buffalo follicles in vitrified-warmed ovarian tissues. **Reproduction in Domestic Animals**, v.51, p. 795–803, 2016.
- ABDON, A. P. V.; SOUZA, G. C.; SOUZA, L. N. C.; VASCONCELOS, R. P.; CASTRO, C. A.; GUEDES, M. M.; JÚNIOR, R. C. P. L.; MOREIRA, R. A.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; CAMPOS, A. R. Gastroprotective potential of frutalin, a d-galactose binding lectin, against ethanol-induced gastric lesions. **Fitoterapia**, v. 83, p.604–608, 2012.
- ABIR, R.; BEN-HAROUSH, A.; FELZ, C.; OKON, E.; RAANANI, H.; ORVIETO, R.; NITKE, S.; FISCH, B. Selection of patients before and after anticancer treatment for ovarian cryopreservation. **Human Reproduction: Oxford Journals**, v.23, p. 869–877, 2008.
- ABIR, R.; NITKE, S.; BEN-HAROUSH A.; FISCH B. *In vitro* maturation of human primordial ovarian follicles: Clinical significance, progress in mammals, and methods for growth evaluation. **Histology. Histopathology**, v. 21, p.887-898, 2006.
- ACKERMANN, C. L.; ASA, C. S.; KRISHER, R.; BAUMAN, K.; CASEY, S. LOPES, M. D. Evaluation of follicular growth and tissue viability in vitrified/ warmed domestic dog ovaries after in vitro culture. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, p. 1–5, 2016.
- ADHIKARI, D.; LIU, K. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. **Endocrine Reviews**, v. 30, p.438-464, 2009.
- AKDEMIR, A.; ZEYBEK, B.; AKMAN, L.; ERGENOGLU, A. M.; YENIEL, A. O.; ERBAS O.; YAVASOGLU A.; TEREK, M. C.; TASKIRAN, D. Granulocyte-colony stimulating factor decreases the extent of ovarian damage caused by cisplatin in an experimental rat model. **Journal of Gynecologic Oncology**, v. 25, p. 328-333, 2014.
- ALONSO-POZOS, I.; ROSALES-TORRES, A. M.; AVALOS-RODRIGUEZ, A.; VERGARA-ONOFRE, M.; ROSADO-GARCÍA A. Mechanism of granulosa cell death during follicular atresia depends on follicular size. **Theriogenology**, v. 60, p.1071-1081, 2003.
- ANAND, P.; KUNNUMAKKARA, A. B.; SUNDARAM, C.; HARIKUMAR, K. B.; THARAKAN, S. T.; LAI, O. S.; SUNG, B.; AGGARWAL, B. B. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. **Pharmaceutical Research** v. 25, p. 2097-2116, 2008.
- ARNON, J.; MEIROW, D.; LEWIS-RONESS, H.; ORNOY, A. Genetic and teratogenic effects of cancer treatment on gametes and embryos. **Human Reproduction**, v. 7, p.394-403, 2001.

- ARUNAKUMARI, G.; SHANMUGASUNDARAM, N.; RAO, V. H. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. **Theriogenology**, v. 74, p. 884-894, 2010.
- ASHLEY, N.; POULTON, J. Mitochondrial DNA is a direct target of anticancer anthracycline drugs. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.378, p. 431-447, 2009.
- ASHRAF, M. T.; KHAN, R. H. Mitogenic lectins. **Medical Science Monitor**, v. 9, n.11, p.265-269, 2003.
- BAH, C.S.; FANG, E.F.; NG, T.B.; MROS, S.; MCCONNELL, M.; BEKHIT AEL, D. Purification and characterization of a rhamnose-binding chinook salmon roe lectin with antiproliferative activity toward tumor cells and nitric oxide-inducing activity toward murine macrophages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 59, p. 5720-5728, 2011.
- BAILAR, J. C.; GORNIK, H. L. Cancer undefeated. **The New England Journal of Medicine**, v. 336, p. 1569-1574, 1997.
- BANDEIRA, F. T.; CARVALHO, A. A.; CASTRO, S. V.; LIMA, L. F.; VIANA, D. A.; EVANGELISTA, J. S. A.M.; PEREIRA, M. J. S.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J. R. RODRIGUES, A. P. R. Two Methods of Vitrification Followed by In Vitro Culture of the Ovine Ovary: Evaluation of the Follicular Development and Ovarian Extracellular Matrix. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 50, p.177-185, 2015.
- BARRE, A.; VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; ROUG, P. Structure-Function Relationship of Monocot Mannose-Binding Lectins. **Plant Physiology**. v. 112, p. 1531-1540, 1996.
- BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: Oga, Seizi. **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 60-70.
- BARROSO, G.M. **Systematica de angiospermas no Brasil**. São Paulo: EDUSP: 1978.
- BEN-AHARON, I.; BAR-JOSEPH, H.; TZARFATY, G.; KUCHINSKY, L.; RIZEL, S.; STEMMER, S. M.; SHALGI, R. Doxorubicin-induced ovarian toxicity. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.4, p. 8-20, 2010.
- BEN-NASR, H.; ABDERRAHIM, M. A. B.; SALAMA, M.; KSOUDA, K.; ZEGHAL, K. M. Potential Phytotherapy use of Artemisia Plants: Insight for Anti-Hypertension. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, p. 120-125, 2013.
- BHUTIA, S. K.; BEHERA, B.; DAS, D. N.; MUKHOPADHYAY, S.; SINHA, N.; PANDA, P. K.; NAIK, P. P.; PATR, S. K.; MANDAL, M.; SARKAR, S.; MENEZES, M. E.; TALUKDAR, S.; MAITI, T. K.; DAS, S. K.; SARKAR, D.; FISHER, P. B. *Abrus* agglutinin is a potent anti-proliferative and anti-angiogenic agent in human breast câncer. **International Journal of Cancer**, 2016. DOI: 10.1002/ijc.30055

BIES, C.; LEHR, C.M.; WOODLEY, J. F. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 425–435, 2004.

BONNET, A.; CABAU, C.; BOUCHEZ, O.; SARRY, J.; MARSAUD, N.; FOISSAC, S.; WOLOSZYN, F.; MULSANT, P.; MANDON, P. B. An overview of gene expression dynamics during early ovarian folliculogenesis: specificity of follicular compartments and bi-directional dialog. **BMC Genomics**, v. 14, p. 904, 2013.

BONNET, A.; DALBIES-TRAN, R.; SIRARD, M. A. Focus on mammalian embryogenomics opportunities and challenges in applying genomics to the study of oogenesis and folliculogenesis in farm animals. **Reproduction**, v. 135, p.119–128, 2008.

BRANDO-LIMA, A. C.; SALDANHA-GAMA, R. F.; PEREIRA, C. R.; VILLELA, C. G.; SAMPAIO, A. L. F.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C.O.; HENRIQUES, M. G. M. O.; MOREIRA, R. A.; BARJA-FIDALGO, C. Involvement of phosphatidylinositol-3 kinase–Akt and nuclear fator kappa-B pathways in the effect of frutalin on human lymphocyte. **International Immunopharmacology**, v.6, p.465–472, 2006.

BRANDO-LIMA, A. C.; SALDANHA-GAMA, R. F.; HENRIQUES, M. D.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C.; MOREIRA, R. A.; BARJA-FIDALGO, C. Frutalin, a galactose-binding lectin, induces chemotaxis and rearrangement of actin cytoskeleton in human neutrophils: involvement of tyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 15, n. 208, p.145-54, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. **Portaria 116, de 08 de agosto de 1996**. Diário Oficial da União, 1996.

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

BRISTOL-GOULD, S. K.; KREEGER, P. K.; SELKIRK, C. G.; KILEN, S. M.; MAYO, K. E.; SHEA, L. D.; WOODRUFF, T. K. Fate of the initial follicle pool: empirical and mathematical evidence supporting its sufficiency for adult fertility, **Developmental Biology**, v.298, p.149-154, 2006.

CALVETE, J. J.; COSTA, F. H.; SAKER-SAMPAIO, S.; MURCIANO, M. P.; NAGANO, C.S.; CAVADA, B. S.; GRANGEIRO, T. B.; RAMOS, M. V.; BLOCH JUNIOR, C.; SILVEIRA, S. B. The amino acid sequence of the agglutinin isolated from the red marine alga *Bryothamnion triquetrum* defines a novel lectin structure. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v.57, p. 343–350, 2000.

CARROLL, J.; WHITTINGHAM, D. G.; WOOD, M. J.; TELFER, E.; GOSDEN, R. G. Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, p.321-327, 1990.

CARVALHO, A. S.; SILVA, M.V.; GOMES, F. S.; PAIVA, P. M.; MALAFAIA, C. B.; SILVA, T. D.; VAZ, A. F.; SILVA, A. G.; ARRUDA, I. R.; NAPOLEÃO, T. H.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. D.; CORREIA, M. T. Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 75, p. 402-408, 2015.

CARVALHO, C.; SANTOS, R. X.; CARDOSO, S.; CORREIA, S.; OLIVEIRA, P. J.; SANTOS, M. S.; MOREIRA, P. I. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, p.3267–3285, 2009.

CAVADA, B. S.; MORENO, F. B. B.; ROCHA, B. A. M.; AZEVEDO JÚNIOR, W. F.; CASTELLO, R. E. R.; GOERSCH, G. V.; NAGANO, C. S.; SOUZA, E. P.; NASCIMENTO, K. S.; RADIS-BAPTISTA, G.; DELATORRE, P.; LEROY, Y.; TOYAMA, M. H.; PINTO, V. P. T.; SAMPAIO, A. H.; BARETTINO, D.; DEBRAY, H.; CALVETE, J. J.; SANZ, L. cDNA cloning and 1.75 Å crystal structure determination of PPL2, an endochitinase and N-acetylglucosamine-binding hemagglutinin from *Parkia platycephala* seeds. **FEBS Journal**. v. 273, p.3962–3974, 2006.

CAVADA, B. S.; SANTOS, C. F.; GRANJEIRO, T. B., NUNES, E. P.; SALES, P. V. P.; RAMOS, R. L.; DE SOUZA, F. A. M., CRISOSTOMO, C. V., CALVETE, J. J. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. **Phytochemistry**. v. 49, p. 675-680, 1998.

CELESTINO, J. J. H.; BRUNO, J. B.; SARAIVA, M. V. A.; ROCHA, R. M. P.; BRITO, I. R.; DUARTE, A. B. G.; ARAÚJO, V. R.; SILVA, C. M. G.; MATOS, M. H. T.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Steady-state level of epidermal growth factor (EGF) mRNA and effect of EGF on *in vitro* culture of caprine preantral follicles. **Cell and Tissue Research**, v. 344, p. 539, 2011.

CELESTINO, J. J.H.; CHAVES, R.N.; MATOS, M. H. T.; SARAIVA, M. V.A.; SILVA, J. R.V.; BRUNO, J. B.; MAIA-JÚNIOR, J. E. FIGUEIREDO, J. R. Mechanisms of atresia in ovarian follicles. **Animal Reproduction**, v.6, p.495-508, 2009.

CHASSOT, A. A.; GREGOIRE, E. P.; LAVERY, R.; TAKETO, M. M.; ROOIJ, D. G.; ADAMS, I. R.; CHABOISSIER, M. C. RSP01/β-catenin signaling pathway regulates oogenesis differentiation and entry into meiosis in the mouse fetal ovary. **PLoS One**.v. 6, 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**, v.20, p.640-647, 2008.

CHEN, M.; WANG, J. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. **Apoptosis**, v. 7, p. 313–319, 2002.

CHEUNG, R. C. F.; LEUNG, H. H.; PAN, W. L.; NG, T. B. A calcium ion-dependent dimeric bean lectin with antiproliferative activity toward human breast cancer MCF-7 Cells. **The Protein Journal**, v. 32, p. 208–215, 2013. DOI 10.1007/s10930-013-9477-2

CLARKE P. G. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms, **Anatomy and Embryology**, v.181, p.195–213, 1990.

COLLINGE, D. B.; KRAGH, K. M.; MIKKELSEN, J. D.; NIELSEN, K. K.; RASMUSSEN, U.; VAD, K. Plant chitinases. **The Plant Journal**. v. 3, p.31-40, 1993.

COSTA, S.; ALMEIDA, A.; CASTRO, A.; DOMINGUES, L. Fusion tags for protein solubility, purification, and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p.63, 2014.

CUNHA, E. V.; COSTA, J. J. N.; ROSSI, R.O.D.S.; SILVA, A.W.B.; PASSO, J. R.S.; PORTELA, A.M.L.R.; PEREIRA, D.C.S.T.; DONATO, M.A.M.; CAMPELLO, C.C.; SARAIVA, M.V.A.; PEIXOTO, C.A.; SILVA, J.R.V.; SANTOS, R.P. Phytohemagglutinin improves the development and ultrastructure of *in vitro*-cultured goat (*Capra hircus*) preantral follicles. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46, n.3, p. 245-52, 2013.

CUSHMAN, R. A.; WAHL, C. M.; FORTUNE, J. E. Bovine ovarian cortical pieces grafted to chick embryonic membranes: a model for studies on the activation of primordial follicles. **Human Reproduction**, v. 17, p. 48-54, 2002.

DAVITASHVILI, E.; KAPANADZE, E.; KACHLISHVILI, E.; MIKIASHVILI, N. A.; ELISASHVILI, V. Isolation and Characterization of Lectins Formed by *Cerrena unicolor* (*Higher Basidiomycetes*) in Solid-State Fermentation of Sorghum and Wheat Straw. **International Journal of Medicinal Mushrooms**. v. 17, n.5, p. 427-434, 2015.

DE VOS, M.; SMITZ, J.; WOODRUFF, K. Fertility preservation in women with cancer. **The Lancet**, v. 384, n. 9950, p. 1302–1310, 2014.

DEMEESTERE, I.; CENTNER, J.; GERVY, Y.; DELBAERE, A. Impact of various endocrine and paracrine factors on *in vitro* culture of preantral follicles in rodents. **Reproduction**, v.130, p.147-156, 2005.

DEEPA, M.; PRIYA, S. Purification and characterization of a novel anti-proliferative lectin from *Morus alba* L. leaves. **Protein & Peptide Letters**. v.19, n.8, p.839-45, 2012.

DING, D.; ALLMAN, B. L.; SALVI, R. Review: ototoxic characteristics of platinum antitumor drugs. **The Anatomical Record**, v.295, p. 1851-1867, 2012.

DRIANCOURT, M. A.; FAIR, T.; REYNAUD, K. Oocyte apoptosis: when, how, why?. **Contracept Fertil Sex**, v. 26, p. 522 – 527, 1998.

EDDY, E.M.; CLARK, J.M.; GONG, D.; FENDERSON, B.A. Origin and migration of primordial germ cells in mammals. **Gamete Research Journal**, v. 4, p. 333-362, 1981.

EDINGER, A.L.; THOMPSON, C. B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. **Current Opinion in Cell Biology**, v.16, p. 663-669, 2004.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v.35, p. 495–516, 2007. doi: 10.1080/01926230701320337

ELVIN, J. A.; YAN, C.; MATZUK, M. M. Oocyte-expressed TGF-beta superfamily members in female fertility. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.159, p.1-5, 2000.

ENRIGHT H.; HEBBEL R, P. NATH K. A. Internucleosomal cleavage of DNA as the sole criterion for apoptosis may be artifactual. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 124, p. 63-68, 1994.

ERICKSON, G. F.; WILLIAMS, C. J. **Morphology and physiology of the ovary**. Endotext, Chapter 2, 2008.

ETZLER, M. E. Isolation and Characterization of Subunits of DB58, a lectin from the stems and leaves of *Dolichos biflorus*. **Biochemistry**. v. 33, p. 9778–9783, 1994.

FADDY, M. J.; GOSDEN, R. G.; GOUGEON, A.; RICHARDSON, S. J.; NELSON, J. F. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. **Human Reproduction**, v.7, p.1342-1346, 1992.

FANG, E. F.; PAN, W. L.; WONG, J. H.; CHAN, Y. S.; YE, X. J.; NG, T. B. A new *Phaseolus vulgaris* lectin induces selective toxicity on human liver carcinoma Hep G2 cells. **Archives of Toxicology**, v.85, p.1551–1563, 2011.

FERRIZ-MARTINEZ, R.A.; TORRES-ARTEAGA, I. C.; BLANCO-LABRA, A. **Lectins as Anticancer Agents In: New Approaches in the Treatment of Cancer**. p.71-89, 2010. ISBN, 978-1-61728-304-8.

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. São Paulo: **Varela**, p.227-260, 2001.

FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V. J. F. (Ed.), **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**, São Paulo: Livraria Roca, p. 303-327, 2008.

FINDLAY, J. K.; BRITT, K.; KERR, J. B.; O'DONNELL, L.; JONES, M. E.; DRUMMOND, A. E.; SIMPSON, E. R. The road to ovulation: the role of oestrogens. **Reproduction Fertility and Development Journal**, v.13, p.543-547, 2001.

- FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. **Infection and Immunity**, v.73, p.1907-1916, 2005.
- FLEISCHER, R. T.; VOLLENHOVEN, B. J.; WESTON, G. C. The effects of chemotherapy and radiotherapy on fertility in premenopausal women. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v.66, p. 248-285, 2011.
- FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.135-163, 2003.
- FRESHNEY, R. I. In: **Culture of animals cells: A manual of basic technique**. 3 ed. New York: Wiley-Liss, 1994. p. 486.
- FROTA, I, M. A.; LEITÃO, C. C. F.; COSTA, J. J. N.; VAN DEN HURK, R.; SARAIVA, M. V. A.; FIGUEIREDO, J. R.; SILVA, J. R. V. Levels of BMP-6 mRNA in goat ovarian follicles and in vitro effects of BMP-6 on secondary follicle development. **Zygote**. v.21, p. 270-278, 2013.
- FU, L.L.; ZHOU, C. C.; YAO, S.; YU, J. Y.; LIU, B.; BAO, J. K. Plant lectins: targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 43, p.1442-1449, 2011.
- FULDA, S. Alternative Cell Death Pathways and Cell Metabolism. **International Journal of Cell Biology**. p.1-4, 2013.
- GADDUCCI, A.; COSIO, S.; GENAZZANI, A. R. Ovarian function and childbearing issues in breast cancer survivors. **Gynecological Endocrinology**, v.23, p. 625-631, 2007.
- GALLUZZI, L.; VANDEN BERGHE, T.; VANLANGENAKKER, N.; BUETTNER, S.; EISENBERG, T.; VANDENABEELE, P.; MADEO, F.; KROEMER, G. **Chapter one – Programmed Necrosis: From Molecules to Health and Disease. International Review of Cell and Molecular Biology**. v.289, p.1-35, 2011.
- GEORGES, A.; AUGUSTE, A.; BESSIÈRE, L.; VANET, A.; TODESCHINI, A. L.; VEITIA, R. A. FOXL2: a central transcription factor of the ovary. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.52, p. 17- 33, 2014.
- GEWIRTZ, D. A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. **Biochemical Pharmacology**, v. 57, p. 727–741, 1999.
- GHA. C.A. FERREIRA, C. MASIDEA, N.A.R. SÁ, D.D. GUERREIRO, H.H.V. CORREIA, J. LEIVA-REVILLA, C.H. LOBO, V.R. ARAÚJO, G.A. APGARD, F.Z. BRANDÃO, J.R. FIGUEIREDOA, C.C. CAMPELLO. Balance of insulin and FSH concentrations improves their in vitro development of isolated goat preantral follicles in medium containing. **Animal Reproduction Science**, v.165, p. 1-10, 2016.

GHAYUR, T.; HUGUNIN, M.; TALANIAN, R. V.; RATNOFSKY, S.; QUINLAN, C.; EMOTO, Y.; PANDEY, P.; DATTA, R.; HUANG, Y.; KHARBANDA, S.; ALLEN, H.; KAMEN, R.; WONG, W.; KUFE, D. Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE/CED 3-like protease induces characteristics of apoptosis. **The Journal of Experimental Medicine**, v.184, p.2399–2404, 1996.

GIGLI, M.; RASOANAIVO, T. W.; MILLOT, J. M.; JEANNESSON, P.; RIZZO, V.; JARDILLIER, J. C. ARCAMONE F, MANFAIT M. Correlation between growth inhibition and intranuclear doxorubicin and 4'-deoxy-4'-iododoxorubicin quantitated in living K562 cells by microspectrofluorometry. **Cancer Research**, v. 49, p. 560–564, 1989.

GILCHRIST, R. B.; RITTER, L. J.; ARMSTRONG, D. T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p. 431-46, 2004.

GONFLONI S. DNA damage stress response in germ cells: role of c-Abl and clinical implications. **Oncogene**, v.29, p. 6193–6202, 2010.

GONZÁLEZ DE MEJÍA, E.; PRISECARU, V. I. Lectins as bioactive plant proteins: a potential in câncer treatment. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 425-445, 2005.

GOUGEON A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. **Endocrine Reviews**, v.17, p.121-155, 1996.

GOUGEON, A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. **Human Reproduction**, v.1, p. 81-87, 1986.

GRIVE, K. J.; FREIMAN, R. N. The developmental origins of the mammalian ovarian reserve. **Development**, v.142, p. 2554-2563, 2015.

GUICCIARDI, M. E; GORES, G. J. Life and death by death receptors. **The FASEB Journal**, v. 23, p. 1625-1637, 2009.

GUIGON, C. J.; MAGRE, S. Contribution of germ cells to the differentiation and maturation of the ovary: insights from models of germ cell depletion. **Biology of Reproduction**, v. 74, p.450–458, 2006.

HADDAD, J. J. The role of Bax/Bcl-2 and pro-caspase peptides in hypoxia/reperfusion-dependent regulation of MAPK (ERK): discordant proteomic effect of MAPK (p38). **Protein & Peptide Letters**, v.14, p.361-371, 2007.

HALDAR C.; GHOSH S. Immune Modulation in Goats by Melatonin and Other Hormones: A Novel Horizon of Research. **Journal of Immunology Research**, v. 1, p. 1-7, 2014.

HARDY, K.; FENWICK, M.; MORA, J.; LAIRD, M.; THOMSON, K.; FRANKS, S. Onset and heterogeneity of responsiveness to FSH in mouse preantral follicles in culture. **Endocrinology**, 2016. doi: 10.1210/en.2016-1435.

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

HERREWEGHE, F. V.; FESTJENS, N.; DECLERCQ, W.; VANDENABEELE, P. Tumor necrosis factor-mediated cell death: to break or to burst, that's the question. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.67, p.1567–1579, 2010.

HIROSE, Y.; SIMON, J. A.; OU, H. C. Hair cell toxicity in anti-cancer drugs: evaluating an anti-cancer drug library for independent and synergistic toxic effects on hair cells using the zebrafish lateral line. **Journal of the Association for Research in Otolaryngology**, v. 12, p. 719-728, 2011.

HIRSHFIELD N. A. Relationship between the supply of primordial follicles and the onset of follicular growth in rats. **Biology of Reproduction**, v.50, p.421–428, 1994.

HORNICK, J.E.; DUNCAN F.E.; SHEA L.D.; WOODRUFF, T.K. Isolated primate primordial follicles require a rigid physical environment to survive and grow *in vitro*. **Human Reproduction**, v.27, n.6, p.1801-1810, 2012.

HSU H.; XIONG J.; GOEDDEL, D.V. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. **Cell**, v.81, p.495-504, 1995.

HSUEH, A. J.; KAWAMURA, K.; CHENG, Y.; FAUSER, B. C. Intraovarian control of early folliculogenesis. **Endocrine Reviews**, v.36, p.1–24, 2015.

HUNTER, M. G.; ROBINSON, R. S.; MANN, G. E.; WEBB, R. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. **Animal Reproduction Science**, v.82, p.461–477, 2004

HUSSEIN, M. R. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. **Human Reproduction Update**, v. 11, n. 2, p. 162-77, 2005.

HUSSEIN, T. S.; FROILAND, D. A.; AMATO, F.; THOMPSON, J. G.; GILCHRIST, R. B. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. **Journal of Cell Science**, v.118, p.5257-5268, 2005.

INBAR, M.; SACHS, L. Interaction of the Carbohydrate-Binding protein Concanavalin A with normal and transformed cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 63, p.1418–1425, 1969.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – INCA. 2016. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>>. Acesso em: 18 abr. 2016.

IRVING-RODGERS, H. F.; VAN WEZEL, I. L.; MUSSARD, M. L.; KINDER, J. E.; RODGERS, R. J. Atresia revisited: two basic patterns of atresia of bovine antral follicles. **Reproduction**, v.122, p. 761–775, 2001.

JACOBSON, M. D., WEIL, M. RAFF, M. C. Programmed cell death in animal development. **Cell**, v.88, p. 347-54, 1997.

JERUSS, J. S.; WOODRUFF, T. K. Preservation of fertility in patients with cancer. **The New England Journal of Medicine**, v.360, p.902-911, 2009.

JIMENEZ, C. R.; ARAÚJO, V. R.; PENITENTE-FILHO, J. M.; AZEVEDO, J. L.; SILVEIRA, R. G.; TORRES, C. A. A. The base medium affects ultrastructure and survival of bovine preantral follicles cultured in vitro. **Theriogenology**, v. 85, p.1019–1029, 2016.

JIN, Z.; EL-DEIRY, W. S. Overview of cell death signaling pathways. **Cancer Biology & Therapy**, v. 4, p.139-163, 2005.

JINKU, B.; ZHONGKUI, Z.; HONG, Z. Purification and characterization of *Polygonatum cyrtonema*. **Europe PMC**, v.12, p.165–170, 1996.

JOLLY, P. D.; TISDALL, D. J.; HEATH, D. A.; LUN, S.; MCNATTY, K. P.. Apoptosis in bovine granulosa cells in relation to steroid synthesis, cycle adenosine 3',5'-monophosphate response to follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and follicular atresia. **Biology of Reproduction**, v. 51, p. 934-944, 1994.

KABIR S. Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seedderived lectin of versatile applications in immunobiological research. **Journal of Immunological Methods**, v.212, p. 193-111,1998.

KABIR, S. The isolation and characterisation of jacalin [*Artocarpus heterophyllus* (jackfruit)] lectina based on its charge properties. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 27, p.147, 1995.

KAIPIA, A.; HSUEH, A. J. Regulation of ovarian follicle atresia. **Annual Review of Physiology**, v. 59, p. 349-363, 1997.

KAKUA, H.; PEUMANS, W. J.; GOLDSTEIN, I. J. Isolation and characterization of a second lectin (SNA-II) present in elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 277, p. 255–262, 1990.

KALICH-PHILOSOPH, L.; RONESS, H.; CARMELY, A.; FISHEL-BARTAL, M.; LIGUMSKY, H.; PAGLIN, S.; WOLF, I.; KANETY, H.; SREDNI, B.; MEIROW, D. Cyclophosphamide triggers follicle activation causing ovarian reserve 'burnout'; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility. **Science Translational Medicine**, v.15, p.185, 2013.

KALIMUTHU, S.; SE-KWON. K. Cell Survival and Apoptosis Signaling as Therapeutic Target for Cancer: Marine Bioactive Compounds. **International Journal of Molecular Sciences**, v.14, p. 2334-2354, 2013.

KAUR, M.; SINGH, K.; RUP, P. J.; SAXENA, A. K.; KHAN, R. H.; ASHRAF, M. T.; KAMBOJ, S. S.; SINGH, J. A tuber lectin from *Arisaema helleborifolium* Schott with anti-insect activity against melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) and anti-cancer effect on human cancer cell lines. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 445, p. 156-165, 2006.

KAWAMURA, K.; CHENG, Y.; SUZUKI, N.; DEGUCHI, M.; SATO, Y.; TAKAE, S.; HO, C. H.; KAWAMURA, N.; TAMURA, M.; HASHIMOTO, S.; SUGISHITA, Y.; MORIMOTO, Y.; HOSOI, Y.; YOSHIOKA, N.; ISHIZUKA, B.; HSUEH, A. J. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.22, p.110-143, 2013.

KERR, J. F., WYLLIE, A. H., AND CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, p. 239–57, 1972.

KHEEREE, N.; SANGVANICH, P.; PUTHONG, S.; KARNCHANATAT, A. Antifungal and antiproliferative activities of lectin from the rhizomes of *Curcuma amarissima* Roscoe. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 912-925, 2010.

KHIL, L.; KIM, W.; LYU, S.; PARK, W. B.; YOON, J.; JUN, H. Mechanisms involved in *Korean mistletoe* lectin-induced apoptosis of cancer cells. **World J Gastroenterol**. v.28, p. 2811–2818, 2007.

KIM, Y. J.; VARKI, A. Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. **Glycoconjugate Journal**, v.14, p.569-576, 1997.

KIM, Y. J.; KIM, Y. K.; KANG, B. C.; KIM, M. S. KO, I. K. LIU, H. C. ROSENWAKS, Z. KU, S. Y. Induction of multiple ovulation via modulation of angiotensin II receptors in in vitro ovarian follicle culture models. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. 2016. DOI: 10.1002/term.2214.

KRUIP, T. A.; DIELEMAN, S. J. Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures. **Reproduction Nutrition Development**, v.22, p. 465-73, 1982.

KUMAR, V.; ABBAS A.; FAUSTO N.; MITCHELL R. **Robbins Patologia Básica**. 8 ed. São Paulo: Elsevier, 2008.

LAFONT, V.; HIVROZ, C.; CARAYON, P.; DORNAND, J.; FAVERO, J. The lectin jacalin specifically triggers cell signaling in CD4+ T lymphocytes. **Cellular Immunology**, v.181, p. 23-29, 1997.

LAL, S.; MAHAJAN, A.; CHEN, W. N.; CHOWBAY, B. Pharmacogenetics of target genes across doxorubicin disposition pathways: a review. **Current Drug Metabolism**, v. 11, p. 115-228, 2010.

LAZEBNIK Y. A.; KAUFMANN S. H.; DESNOYERS S.; POIRIER G. G.; EARNSHAW W.C. Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. **Nature**, v.371, p.346–347, 1994.

LEE, S, J.; SCHOVER, L. R.; PARTRIDGE, A. H.; PATRIZIO, P.; WALLACE, W. H.; HAGERTY, K.; BECK, L. N.; BRENNAN, L. V.; OKTAY, K. American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. **Journal of Clinical Oncology**, v.24, p.2917, 2006.

LEIVA-REVILLA, J.; LIMA, L. F.; CASTRO, S. V.; CAMPELLO, C. C.; ARAÚJO, V. R.; CELESTINO, J. J.; PESSOA, O. D.; SILVEIRA, E. R.; RODRIGUES, A. P.; FIGUEIREDO, J. R. Fraction of *Auxemma oncocalyx* and *Oncocalyxone A* affects the *in vitro* survival and development of caprine preantral follicles enclosed in ovarian cortical tissue. **Forsch Komplementmed**, v. 23, n. 5, p.307-313, 2016.

LETOURNEAU, J. M.; EBBEL, E. E.; KATZ, P. P.; OKTAY, K. H.; MCCULLOCH, C. E.; AI, W. Z.; CHIEN, A. J.; MELISKO, M. E.; CEDARS, M. I.; ROSEN, M. P. Acute ovarian failure underestimates age-specific reproductive impairment for young women undergoing chemotherapy for cancer. **Cancer**, v. 118, p. 1933-1939, 2012.

LI, W. W.; YU, J. Y.; XU, H. L.; BAO, J. K. Concanavalin A: a potential antineoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.414, p.282-286, 2011.

LIANG, Y.; FENG, L.; TONG, X.; WANG, K.; LI DE, F.; LIN, J. C.; TANG, Z. J.; LIU, H. H.; JIANG, S.; GUO, L.; WANG DA, C.; SUN H. Importance of nuclear localization for the apoptosis-induced activity of a fungal galectin AAL (*Agrocybe aegerita* lectin). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.386, n.3, p.437-42, 2009.

LIN, J. K.; TSERNG, K. Y.; CHEN, C. C.; LIN, L. T.; TUNG, T. C. Abrin and ricin: new anti-tumor substances. **Nature**, v. 227, p. 292-293, 1970.

LIN, S.Y.; MORRISON, J.R.; PHILLIPS, D.J.; KRETSER, D.M. Regulation of ovarian function by the TGF-beta superfamily and follistatin. **Reproduction**, v. 126, p. 133–148, 2003.

LIU, B.; MIN, M. W.; BAO, J. K. Induction of apoptosis by Concanavalin A and its molecular mechanisms in cancer cells. **Autophagy**, v. 5, p. 432-433, 2009.

LIU, G.; WANG, T.; WANG, T.; SONG, J.; ZHOU, Z. Effects of apoptosis-related proteins caspase-3, Bax and Bcl-2 on cerebral ischemia rats. **Biomedical Reports**, v. 1, n. 6, p. 861-67, 2013.

LIVAK K. J.; SCHMITTGEN T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v.25, p.402–408, 2001.

MACEWAN, D. J. TNF ligands and receptors - a matter of life and death. **British Journal of Pharmacology**, v.135, p.855-875, 2002.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **American Journal of Pathology**, v.146, p.3–15, 1995.

MANABE, N.; IMAI, Y.; OHNO, H.; TAKAHAGI, Y.; SUGIMOTO, M.; MIYAMOTO, H. Apoptosis occurs in granulosa cells but not cumulus cells in the atretic antral follicles in the pig ovaries. **Experientia**, v. 52, p. 647-651, 1996.

MARUZZO, M.; RASTRELLI, M.; LUMACHI, F.; ZAGONEL, V.; BASSO, U. Adjuvant and neoadjuvant chemotherapy for soft tissue sarcomas. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, p.1-8, 2013.

MATSUDA, F.; INOUE, N.; MANABE, N.; OHKURA, S. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. **Journal of Reproduction and Development**, v. 58, p. 44-50, 2012.

MATZUK, M.M.; BURNS, K. H.; VIVEIROS, M.M.; EPPIG, J.J. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. **Science**, v. 296, n. 5576, p. 2178-2180, 2002.

MCCALL, K. Genetic control of necrosis—another type of programmed cell death. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 22, p. 882–888, 2010.

MCGEE, E. A.; HSUEH, A. J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocrine Reviews**, v.21, p.200-214, 2000.

MCLAUGHLIN, E. A.; MCIVER, S. C. Awakening the oocyte: controlling primordial follicle development. **Reproduction**, v.137, p.1-11. 2009

MCNATTY, K. P.; SMITH, P.; HUDSON, N. L.; HEATH, D. A.; TISDALL, DJ; O, W. S.; BRAW-TAL, R. Development of the sheep ovary during fetal and early neonatal life and the effect of fecundity genes. **Journal Of Reproduction And Fertility Supplement**, v.49, p.123–35, 1995.

MEIROW, D.; BIEDERMAN, H.; ANDERSON, R. A.; WALLACE, W. H. Toxicity of chemotherapy and radiation on female reproduction. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 53, p.727–739, 2010.

MELO, P.S., DURÁN, N., HAUN, M. Citotoxicity of derivatives from dehydrocrotonin on V79 cells and *Escherichia coli*. **Toxicology**, v. 159, p. 135-141, 2001.

MENGUE, S.S. Uso de plantas medicinais na gravidez. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.11, p.21-35, 2001.

MICHEAU, O.; TSCHOPP, J. Induction of TNF Receptor I-Mediated Apoptosis via Two Sequential Signaling Complexes. **Cell**, v. 114, p.181–190, 2003.

MIYASHITA, T.; NAGAO, K.; KRAJEWSKI, S.; SALVESEN, G. S.; REED, J. C.; INOUE, T.; YAMADA, M. Investigation of glucocorticoid-induced apoptotic pathway: processing of caspase 6 but not caspase-3. **Cell Death & Differentiation**, v.5, p. 1034-1041, 1998.

MONTEIRO-MOREIRA, A. C.; PEREIRA, H. D.; VIEIRA NETO, A. E.; MORENO, F. B. M. B.; LOBO, M. D. P.; SOUSA, F. D.; MOREIRA R. A. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of frutalin, an α -D-galactose-specific lectin from *Artocarpus incisa* seeds. **Acta Crystallographica**, v. 7, p. 1282-1285, 2015.

MOREIRA, R.A.; CASTELO-BRANCO, C. C.; MONTEIRO, A. C.; TAVARES, R. O.; BELTRAMINI, L. M. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. **Phytochemistry**, v. 47, p. 1183-1188, 1998.

MORGAN, R. J. JR.; ARMSTRONG, D. K.; ALVAREZ, R. D.; BAKKUM-GAMEZ, J. N.; BEHBAKHT, K.; CHEN, L. M.; COPELAND, L.; CRISPENS, M. A.; DEROSA, M.; DORIGO, O.; GERSHENSON, D. M.; GRAY, H. J.; HAKAM, A.; HAVRILESKY, L. J.; JOHNSTON, C.; LELE, S.; MARTIN, L.; MATULONIS, U. A.; O'MALLEY, D. M.; PENSON, R. T.; PERCACC-LIMA, S.; PINEDA, M.; PLAXE, S. C.; POWELL, M. A.; RATNER, E.; REMMENGA, S. W.; ROSE, P. G.; SABBATINI, P.; SANTOSO, J. T.; WERNER, T. L.; BURNS, J.; HUGHES, M. Ovarian cancer, version 1.2016, Clinical practice guidelines in oncology. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network Netw**, v. 14, n. 9, p.1134-164, 2016.

MORGAN, S.; ANDERSON, R. A.; GOURLEY, C.; WALLACE, W. H.; SPEARS, N. How do chemotherapeutic agents damage the ovary?. **Human Reproduction**, v. 18, n.5, p. 525–35, 2012.

National Clinical Effectiveness Committee (NCEC). Department of Health. Diagnosis, staging and treatment of patients with breast cancer. **National Clinical Guideline**, n. 7. 2015. ISSN 2009-6259.

NIKOLETOPOULOU, V.; MARKAKI, M.; PALIKARAS, K.; TAVERNARAKIS, N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1822, p.3448-3459, 2013.

NISHI, K.; GUNASEKARAN, V. P.; ARUNACHALAM, J.; GANESHAN, M. Doxorubicin-induced female reproductive toxicity: an assessment of ovarian follicular apoptosis, cyclicity and reproductive tissue histology in Wistar rats. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 25, p.1-10, 2017.

NOBRE, T. M.; PAVINATTO, F. J.; COMINETTI, M. R.; SELISTRE DE ARAÚJO, H. S.; ZANIQUELLI, M. E.; BELTRAMINI L. M. The specificity of frutalin lectin using biomembrane models. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 8, p.1547–1555, 2010.

OKTEM O, OKTAY K. A novel ovarian xenografting model to characterize the impact of chemotherapy agents on human primordial follicle reserve. **Cancer Research**, v.67, 10159–10162, 2007a.

OLIVEIRA C.; TEXEIRA, J. A.; SCHMITT, F.; DOMINGUES, L. A comparative study of recombinant and native frutalin binding to human prostate tissues. **BMC Biotechnology**, v. 9, p.78, 2009a.

OLIVEIRA, C.; COSTA, S.; TEXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. cDNA Cloning and Functional Expression of the α -D -Galactose-Binding Lectin Frutalin in *Escherichia coli*. **Molecular Biotechnology**, v. 43, p. 212–220, 2009b. doi: 10.1007/s12033-009-9191-7

OLIVEIRA, C.; FELIX, W.; MOREIRA, R. A.; TEXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Expression of frutalin, an α -d-galactose-binding jacalin-related lectin, in the yeast *Pichia pastoris* protein expression and purification. **Protein Expression and Purification**, v. 60, p.188–193, 2008.

OLIVEIRA, C.; NICOLAU, A.; TEXEIRA, J. A.; DOMINGUES L. Cytotoxic effects of native and recombinant frutalin, a plant galactose-binding lectin, on HeLa cervical cancer cells. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2011. doi:10.1155/2011/568932

OLIVEIRA, C.; TEXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Recombinant production of plant lectins in microbial systems for biomedical application – the frutalin case study. **Frontiers in Plant Science**, v.5, p. 390, 2014. doi: 10.3389/fpls.2014.00390

ONAL, M.; OVET, G.; ONAL, O. Review of Apoptosis. **MOJ Immunology**, v. 3, n.1, p.73-76, 2016.

ORLANDO, S.C. **Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico bruto da casca do *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (Barbatimão)**. 2005. 88 f. Dissertação (Mestrado em Promoção de Saúde) – Universidade de Franca-SP, 2005.

ORTH, K.; CHINNAIYAN, A. M.; GARG, M.; FROELICH, C. J.; DIXIT, V. M. The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. **The Journal of Biological Chemistry**, v.271, p.16443–16446, 1996.

PANI, G.; COLAVITI, R.; BORRELO, S.; GALEOTTI, T. Endogenous oxygen radicals modulate protein tyrosine phosphorylation and JNK-1 activation in lectin-stimulated thymocytes. **Biochemical Journal**, v. 347, p.173-181, 2000.

PARK, K.S.; LEE, T.H.; PARK, Y.K.; SONG, H.B.; CHUN, S.S. Effects of isolating methods (mechanical or enzymatical) on structure of pre-antral follicles in mouse. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.22, p. 9–10, 2005.

PARKIN S, CRAIG G. Crystallization and X-ray diffraction data for a new form of concanavalin A. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 58, p.1032-1033, 2002.

PARKIN, S.; RUPP, B.; HOPE, H. Atomic resolution structure of concanavalin A at 120 K. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 1, n.52, p.1161-1168, 1996.

PEPLING, M. E.; SPRADLING, A. C. Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. **Developmental Biology**, v. 234, p.339-351, 2001.

PEREIRA, H.M., MOREIRA, A.C.O.M., VIEIRA NETO, A.E., MORENO, F.B.M.B., LOBO, M.D.P., SOUSA, F.D., GRANGEIRO, T.B., MOREIRA, R.A. Crystal Structure of Frutalin from *Artocarpus incisa*. **Protein Data Bank**, 2015. DOI: 10.2210/pdb4wog/pdb

PERVAIZ, A.; ZEPP, M.; ADWAN, H.; BERGER, M. R. Riproximin modulates multiple signaling cascades leading to cytostatic and apoptotic effects in human breast cancer cells. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 142, p. 135-147, 2016.

PETRILLO, S. K.; DESMEULES, P.; TRUONG, T. Q.; DEVINE, P. J. Detection of DNA damage in oocytes of small ovarian follicles following phosphoramidate mustard exposures of cultured rodent ovaries in vitro. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 253, p. 94–102, 2011.

PEUMANS, W, J.; VAN DAMME, E. J. M.; BARRE, A.; ROUGE, P. Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionary related proteins. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 491, p. 27-54, 2001.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**. v.109, p.347–352, 1995.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant Lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, Hants**. v.15, p. 199-227, 1998.

PEUMANS, W. J.; ZHANG, W.; BARRE, A.; ASTOUL, C. H.; BALINT-KURTI, P. J.; ROVIRA, P.; ROUGÉ, P.; MAY, G. D.; VAN LEUVEN, F.; TRUFFA-BACHI, P.; VAN DAMME, E. J. M. Fruit-specific lectins from banana and plantain. **Planta**. v.211, n. 4, p. 546 554, 2000.

PICTON H.; BRIGGS D.; GOSDEN R. The molecular basis of oocyte growth and development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, p.27–37, 1998.

PICTON, H.M.; HARRIS, S.E.; MURUVI, W.; CHAMBERS, E.L. The *in vitro* growth and maturation of follicles. **Reproduction**, v. 136, p. 703-715, 2008.

PORTELA, A.M.L.R.; RIBEIRO, R.P.; COSTA, J.J.N.; ROSSI, R.O.D.S.; PASSOS, J.R.S.; VASCONCELOS, G.L.; DONATO, M.A.M.; PEIXOTO, C.A.; SARAIVA, M.V.A.; VAN DEN HURK, R.; SILVA, J.R.V. Effects of different concentrations of concanavalin A and follicle stimulating hormone on goat primordial follicles activation, survival and gene expression. **Small Ruminant Research**, v. 116, p. 183-191, 2014.

PREYAT, N.; ROSSI, M.; KERS, J.; CHEN, L.; BERTIN, J.; GOUGH, P. J.; LE MOINE, A.; RONGVAUX, A.; VAN GOOL, F.; LEO O. Intracellular nicotinamide adenine dinucleotide promotes TNF-induced necroptosis in a sirtuin-dependent manner. **Cell Death Differ**, v. 23, p. 29-40, 2016.

QIN, A. P.; ZHANG, H. L.; QIN, Z. H. Mechanisms of lysosomal proteases participating in cerebral ischemia-induced neuronal death. **Neuroscience Bulletin**, v. 24, p.117-23, 2008.

RADOVIĆ, N.; CUCIĆ, S, ALTARAC, S. Molecular aspects of apoptosis. **Acta Medica Croatica**, v. 62, p. 249-256, 2008.

RIBEIRO, R. P.; PORTELA, A. M. L. R.; SILVA, A. W. B.; COSTA, J. J. N.; PASSOS, J. R. S.; CUNHA, E. V.; SOUZA, G. B.; SARAIVA, M. V. A.; DONATO, M. A. M.; PEIXOTO, C. A.; VAN DEN HURK, R.; SILVA, J. R. V. Effects of jacalin and follicle-stimulating hormone on in vitro goat primordial follicle activation, survival and gene expression. **Zygote**. v. 23, p. 537-549, 2015.

ROSEN A.; CASCIOLA-ROSEN, L. Macromolecular substrates for the ICElike proteases during apoptosis. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 64, p.50–54, 1997.

ROSSETTO, R.; LIMA, I. M. T.; SARAIVA, M. V. A.; LIMA-VERDE, I. B.; SALES, E. T.; FIGUEIREDO, J. R. Avanços no Isolamento e Sistemas de Cultivo de Folículos Pré-Antrais. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.5, n.1, p.15-23, 2011.

RÜSSE, I. Oogenesis in caule and sheep. **Bibliotheca Anatômica**, v. 24, p.77-92, 1983.

SAIKUMAR, P.; DONG, Z.; MIKHAILOV, V.; DENTON, M.; WEINBERG, J. M.; VENKATACHALAM, M. A. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. **American Journal of Medicine**, v.107, n.5, p. 489-06, 1999.

SALOMÉ, S.; PINHO, S. S.; REIS, C. A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. **Nature Reviews Cancer**, v.15, p. 540-555, 2015.

SANCHEZ, A. M.; VIGANÒ, V. G. P.; CANDIANI, E, P. M.; PANINA-BORDIGNON, G. M. P. Treatment with anticancer agents induces dysregulation of specific Wnt Signaling Pathways in human ovarian luteinized granulosa cells *in vitro* . **Toxicological Sciences**, v. 136, n.1, p.183-192, 2013.

SÁNCHEZ, F.; ADRIAENSSENS, T.; ROMERO, S.; SMITZ, J. Quantification of oocyte specific transcripts in follicle-enclosed oocytes during antral development and maturation in vitro. **Molecular Human Reproduction**, v. 15, p. 539-550, 2009.

SANTOS, A. F. S.; LUZA, L. A.; ARGOLO, A. C. C.; TEXEIRA, J. A.; PAIVA, P. M.G.; COELHO, L. C. B. B. Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. **Process Biochemistry**. v.44, p.504–508, 2009.

- SANTOS, A. F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; BEZERRA, R. F.; CARVALHO, E. V. M. M.; CORREIA, M. T. S.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Strategies to obtain lectins from distinct sources. In: **Leon V. Berhardt, Advances in Medicine and Biology**, New York: Nova Publishers Inc; v. 63, p. 33-60, 2013. ISBN: 978-1-62417-922-8.
- SANTOS, J. M. S.; MENEZES, V. G.; BARBERINO, R. S.; MACEDO, T. J. S.; LINS, T. L. B.; GOUVEIA, B. B.; BARROS, V. R. P.; SANTOS, L. P.; GONCALVES, R. J. S.; MATOS, M. H. T. Immunohistochemical localization of Fibroblast Growth Factor-2 in the sheep ovary and its effects on pre-antral follicle apoptosis and development *in vitro*. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, p.522–528, 2014.
- SARASTE, A. Morphologic criteria and detection of apoptosis. **Herz**, v.24, p.189-95, 1999.
- SAWANOBORI, A.; MORIWAKI, K.; TAKAMATSU, S.; KAMADA, Y.; MIYOSHI E. A glycoproteomic approach to identify novel glycomarkers for cancer stem cells. **Proteomics**, 2016. doi: 10.1002/pmic.201500472.
- SAWYER, H. R.; SMITH, P.; HEATH, D. A.; JUENGEL, J. L.; WAKEFIELD, S. J.; MCNATTY, K. P. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. **Biology of Reproduction**, v.66, p.1134–1150, 2002.
- SCHMIDT, K.; LARSEN, E. C.; ANDERSEN, C.Y.; ANDERSEN N. A. Risk of ovarian failure and fertility preserving methods in girls and adolescents with a malignant disease. **BJOG**, v.117, p.163-174, 2010.
- SCHOTANUS, K.; HOLTKAMP, G. M.; VAN ROOIJEN, N.; TILDERS, F. J.; BERKENBOSCH, F. Circulating tumor necrosis factor-alpha does not mediate endotoxin-induced hypothermia in rats American. **Journal of Physiology**, v. 268, p. 989-996, 1995.
- SENDOEL, A.; HENGARTNER, M. O. Apoptotic Cell Death Under Hypoxia. **Physiology**, v. 29, p. 168 –176, 2014.
- SERAFIM, M. K.; DUARTE, A. B.; SILVA, G. M.; SOUZA, C.E.; MAGALHÃES-PADILHA, D. M.; MOURA, A.A.; SILVA, L. D.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J.R. Impact of growth hormone (GH) and follicle stimulating hormone (FSH) on in vitro canine preantral follicle development and estradiol production. **Growth Hormone & IGF Research**. v. 25, p.85-9, 2015.
- SETHU, S.; MELENDEZ, A. J. New developments on the TNF α -mediated signaling pathways. **Bioscience Reports**, v.31, p. 63 – 76, 2011.
- SHARAPIN, N. Medicinal plants: pharmacopoeial prescriptions. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 71, p. 295-298, 1999.
- SHARON, N. Lectins: past, present and future. **Biochemical Society Transactions**, v. 36, p. 1457–1460, 2008.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 1, n. 11, p. 53–62, 2004.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins: Cell-Agglutinating and Sugar-Specific Proteins. **Science**, v.177, p. 949-959, 1972.

SHOHAM, J.; INBAR, M.; SACHS, L. Differential toxicity on normal and transformed cells in vitro and inhibition of tumor development in vivo by Concanavalin A. **Nature**. v. 227, p. 1244-1246, 1970.

SILVA, J. R. V.; FERREIRA, M. A. L.; COSTA, S. H. F.; SANTOS, R. R.; CARVALHO, F. C. A.; RODRIGUES, A. P. R.; LUCCI, C. M.; BAO, S. N.; FIGUEIREDO J. R. Degeneration rate of preantral follicles in the ovaries of goats. **Small Ruminant Research**, v.43, p.203-209, 2002.

SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R. COSTA, S. H. F.; ANDRADE, E. R.; NUNES, A. P. A.; FERREIRA, F. V. A.; LÔBO, R. N. B.; FIGUEIREDO, J. R. Survival and growth of goat primordial follicles after in vitro culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. **Animal Reproduction Science**, v. 81, p. 273-286, 2004a.

SILVA, J.R.V. **Growth factors in gota ovarios and the role of ativina-A in the development of esrly-staged follicles**. 142f. Thesis (PhD) - Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht, 2005.

SILVA, L. C. N.; FILHO, C. M. B.; PAULA, R. A.; COELHO, L. C. B. B.; SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. D. S. *Cratylia mollis* lectin: a versatile tool for biomedical studies. **Current Bioactive Compounds**, v.10, n.1, p.44-54, 2014.

SILVA, M. C.C.; PAULA, C. A. A.; FERREIRA, J. G.; PAREDES-GAMERO, E. J.; VAZ, A. M. S. F.; SAMPAIO, M. U.; CORREIA, M. T. S.; OLIVA, M. L.V. *Bauhinia forficata* lectin (BfL) induces cell death and inhibits integrin-mediated adhesion on MCF7 human breast cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v.1840, p. 2262–2271, 2014.

SIRIPIPATTHANA, P.; PHAONAKROP, N.; ROYTRAKUL, S.; SENAWONG, G.; MUDALIGE-JAYAWICKRAMA, R. G.; SATTAYASAI, N. The first trimeric *Galanthus nivalis* agglutinin-related lectin of Orchidaceae was found in *Dendrobium pendulum*: purification, characterization, and effects of stress factors. **Plant Cell Reports**, v.34, n.7, p.1253-1262, 2015.

SKINNER, M. K. Regulation of primordial follicle assembly and development. **Human Reproduction Update**, v.11,p. 461-71, 2005.

SMITZ, J.E.J.; CORTVRINDT, R.G. The earliest stages of folliculogenesis *in vitro*. **Reproduction**, v.123, p.185–202, 2002.

SOARES, M. A.; COSTA, J. J.; VASCONCELOS, G. L.; RIBEIRO, R. P.; SOUZA, J. C.; SILVA, A. L.; VAN DEN HURK, R.; SILVA, J. R. Effects of frutalin on early follicle

morphology, ultrastructure and gene expression in cultured goat ovarian cortical tissue. **Histology and Histopathology**, 2017. DOI: 10.14670/HH-11-882

SOLEIMANI, R.; HEYTENS, E.; DARZYNKIEWICZ, Z.; OKTAY, K. Mechanisms of chemotherapy-induced human ovarian aging: double strand DNA breaks and microvascular compromise. **Aging**, v. 3, p. 782–93, 2011.

SUH, E. K.; YANG, A.; KETTENBACH, A.; BAMBERGER, C.; MICHAELIS, A. H.; ZHU, Z.; ELVIN, J. A.; BRONSON, R. T.; CRUM, C. P.; MCKEON, F. p63 protects the female germline during meiotic arrest. **Nature**, v. 444, p.624-628, 2006.

TACAR, O.; SRIAMORNSAK, P.; DASS, C. R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, p.157–70, 2013.

TAMMA, S. M.; KALYANARAMAN, V. S.; PAHWA, S.; DOMINGUEZ, P.; MODESTO, R. R. The lectin jacalin induces phosphorylation of ERK and JNK in CD4+ T cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v.73, p. 682-88, 2003.

TANNE, A.; NEYROLLES, O. C-type lectins in immune defense against pathogens: The murine dc-sign homologue signr3 confers early protection against Mycobacterium tuberculosis infection. **Virulence**, v.1, p. 285–290, 2010.

TELFER, E. E.; MCLAUGHLIN, M.; DING, C.; THONG, K. J. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. **Human Reproduction**, v. 23, p. 1151-1158, 2008.

TELFER, E. E. The Development of Methods for Isolation and Culture of Preantral Follicles from Bovine and Porcine Ovaries. **Theriogenology**, v.45, p.101-110, 1996.

UTSUNOMIYA, T.; TANAKA, T.; UTSUNOMIYA, H.; UMESAKI, N. A novel molecular mechanism for anticancer drug-induced ovarian failure: irinotecan HCl, an anticancer topoisomerase I inhibitor, induces specific FasL expression in granulosa cells of large ovarian follicles to enhance follicular apoptosis. **International Journal of Oncology**, v. 32, p. 991–1000, 2008.

UZUMCU, M.; ZACHOW, R. Developmental exposure to environmental endocrine disruptors: consequences within the ovary and on female reproductive function. **Reproductive Toxicology**, v. 23, p. 337-352, 2007.

VAN DAMME, E. J. M.; ALLEN, A. K.; PEUMANS, W. J. Isolation and characterization of a lectin with exclusive specificity towards mannose from snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulbs. **FEBS Letters**, v. 215, p.140–144, 1987.

- VAN DAMME, E. J. M.; BRIKÉ, F.; WINTER, H. C.; VAN LEUVEN, F.; GOLDSTEIN, I. J.; PEUMANS, W. J. Molecular cloning of two different mannose-binding lectins from tulip bulbs. **European Journal of Biochemistry**. v. 236, p. 419–427, 1996b.
- VAN DAMME, E. J. M.; COOSSENS, K.; SMEETS, K.; LEUVEN, F. V.; VERHAERT, P.; PEUMANS, W. J. The major tuber storage protein of araceae species is a lectin. Characterization and molecular cloning of the lectin from *Arum maculatum* L. **Plant Physiology**. v. 107; n. 4, p.1147-1158, 1995.
- VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; ROUGE, P. Plant lectins : a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical reviews in plant sciences**, v. 17, p. 575-692, 1998.
- VAN DAMME, E. J. M.; VAN LEUVEN, F.; PEUMANS, W. J. Isolation, characterization and molecular cloning of the bark lectins from *Maackia amurensis*. **Glycoconjugate Journal**, v.14, p. 449-456, 1997.
- VAN DEN HURK, R.; SPEK, E. R.; HAGE, W. J.; FAIR, T.; RALPH, J. H.; SCHOTANUS, K. Ultrastructure and viability of isolated bovine preantral follicles. **Human Reproduction**, v. 4, n.6, p. 833-841, 1998.
- VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, p.1717-1751, 2005.
- VAN PARIJS, J, BROEKAERT, W. F, GOLDSTEIN, I. J, PEUMANS, W. J. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**. v.183, n.2, p.258-264. 1991. doi: 10.1007/BF00197797.
- VAN WEZEL, I. L.; DHARMARAJAN, A. M.; LAVRANOS, T. C.; RODGER, R. J. Evidence for alternative pathways of granulosa cell death in healthy and slightly atretic bovine antral follicles. **Endocrinology**, v.140, p. 2602 – 2612, 1999.
- VANDENABEELE, P.; DECLERCQ, W.; HERREWEGHE, F. V.; BERGHE, T. V. The Role of the Kinases RIP1 and RIP3 in TNF-Induced Necrosis. **Science Signaling**, v. 3, 2010.
- VANLANGENAKKER, N.; BERGHE, T. V.; KRYSKO, D. V.; FESTJENS, N.; VANDENABEELE, P. Molecular Mechanisms and Pathophysiology of Necrotic Cell Death. **Molecular Medicine**, v. 8, p.207-220, 2008.
- VELASQUEZ, E. V.; RÍOS, M.; ORTIZ, M. E.; LIZAMA, C.; NUÑEZ, E.; ABRAMOVICH, D.; ORGE, F.; OLIVA, B.; ORELLANA, R.; VILLALON, M.; MORENO, R.D.; TESONE, M.; ROKKA, A.; CORTHALS, G.; CROXATTO, H. B.; PARBORELL, F.; OWEN, G. I. Concanavalin-A induces granulosa cell death and inhibits FSH-mediated follicular growth and ovarian maturation in female rats. **Endocrinology**, v. 154, n.5, p. 1885–1896, 2013.

WANDJI, S. A.; EPPIG, J. J.; FORTUNE, J. E. FSH and growth factors affect the growth and endocrine function in vitro of granulosa cells of bovine preantral follicles. **Theriogenology**, v.45, p.817-832, 1996.

WANDJI, S. A.; SRSEN, V.; NATHANIELSZ, P. W.; EPPIG, J. J.; FORTUNE, J. E. Initiation of growth of baboon primordial follicles in vitro. **Human Reproduction**, v.12, p. 1993-2001, 1997.

WANG, H.X.; NG, T.B. Concurrent isolation of a Kunitz-type trypsin inhibitor with antifungal activity and a novel lectin from *Pseudostellaria heterophylla* roots. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 342, p.349–353, 2006.

WANG, S.; YU, Q.; BAO, J.; LIU, B. *Polygonatum cyrtoneuma* lectin, a potential antineoplastic drug targeting programmed cell death pathways. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 406, p. 497–500, 2011.

WANG, Y.; BU, L.; YANG, L.; LI, H.; ZHANG, S. Identification and functional characterization of fish-egg lectin in zebrafish. **Fish and Shellfish Immunology**, 2016. doi: 10.1016/j.fsi.2016.03.016.

WILLIS, S. N.; FLETCHER, J. I.; KAUFMANN, T.; VAN DELFT, M. F.; CHEN, L.; CZABOTAR, P. E.; IERINO H.; LEE, E. F.; FAIRLIE, W. D.; BOUILLET, P.; STRASSER, A.; KLUCK, R. M.; ADAMS, J. M.; HUANG, D. C. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. **Science**, v.315, p. 856–859, 2007.

WU, L.; LIU, T.; XIAO, Y.; LI, X.; ZHU, Y.; ZHAO, Y.; BAO, J.; WU, C. *Polygonatum odoratum* lectin induces apoptosis and autophagy by regulation of microRNA-1290 and microRNA-15a-3p in human lung adenocarcinoma A549 cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 217–226, 2016.

XIU, Y.; HOU, L.; LIU, X.; WANG, Y.; GU, W.; MENG, Q.; WANG, W. Isolation and characterization of two novel C-type lectins from the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 46, n.2, p. 603-611, 2015.

XU, J.; HENNEBOLD, J. D.; SEIFER, D. B. Direct vitamin D3 actions on rhesus macaque follicles in three-dimensional culture: assessment of follicle survival, growth, steroid, and antimullerian hormone production. **Fertility and Sterility**. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.08.037>.

XU, P.; ZHANG, T.; GUO, X.; MA, C.; ZHANG, X. Purification, characterization, and biological activities of broccolini lectin. **Biotechnology progress**, v. 31, n.3, p. 736-743, 2015.

YAGI, F.; IWAYA, T.; HARAGUCHI, T.; GOLDSTEIN, I. J. The lectin from leaves of Japanese cycad, *Cycas revoluta* Thunb. (gymnosperm) is a member of the jacalin-related family. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n.17, p. 4335-4341, 2002.

YOULE, R. J. Cell biology. Cellular demolition and the rules of engagement. **Science**, v.315, p. 776–7, 2007.

YUCEBILGIN, M. S.; TEREK, M. C.; OZSARAN, A.; AKERCAN, F.; ZEKIOGLU, O.; ISIK, E.; ERHAN, Y. Effect of chemotherapy on primordial follicular reserve of rat: An animal model of premature ovarian failure and infertility. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 44, p. 6–9, 2004.

ZHAI, J.; YAO, G.; DONG, F.; BU, Z.; CHENG, Y.; SATO, Y.; HU, L.; ZHANG, Y.; WANG, J.; DAI, S.; LI, J.; SUN, J.; HSUEH, A. J.; KAWAMURA, K.; SUN, Y.. In Vitro Activation of Follicles and Fresh Tissue Auto-transplantation in Primary Ovarian Insufficiency Patients. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 101, n.11, p.4405–4412. 2016.

ZHANG, D. L.; LV, C. H.; YU, D. H.; WANG, Z. Y. Characterization and functional analysis of a tandem-repeat galectin-9 in large yellow croaker *Larimichthys crocea*. **Fish and Shellfish Immunology**. 2016. doi: 10.1016/j.fsi.2016.03.032.

ZHANG, W.; TIAN, G.; GENG, X.; ZHAO, Y.; NG, T. B.; ZHAO, L.; WANG, H. Isolation and characterization of a novel lectin from the edible mushroom *Stropharia rugosoannulata*. **Molecules**. v.19, n. 12, 2014.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News in Physiological Science**, v.19, p.124-128, 2004.