



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

VITÓRIA SANTOS BEZERRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA PUNICALAGINA NO CULTIVO *IN VITRO* DE
TECIDO OVARIANO DE BOVINOS**

SOBRAL

2023

VITÓRIA SANTOS BEZERRA

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA PUNICALAGINA NO CULTIVO *IN VITRO* DE
TECIDO OVARIANO DE BOVINOS

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

Orientador: Dr. José Roberto Viana Silva
Coorientadora: Dra. Valdevane Rocha Araújo

SOBRAL

2023

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

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

B469a Bezerra, Vitória Santos.

Avaliação do efeito da Punicalagina durante o cultivo in vitro de tecido ovariano bovino /
Vitória Santos Bezerra. – 2023.

84 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2023.

Orientação: Prof. Dr. José Roberto Viana Silva.

Coorientação: Profa. Dra. Valdevane Rocha Araújo.

1. Punicalagina. 2. Cultivo in vitro. 3. Estresse oxidativo. 4. Folículos. 5. Antioxidante. I.
Título.

CDD 660.6

VITÓRIA SANTOS BEZERRA

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA PUNICALAGINA NO CULTIVO *IN VITRO* DE
TECIDO OVARIANO DE BOVINOS

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

Aprovado em: 27/10/2023

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Valdevane Rocha Araújo (Coorientadora)
Universidade Federal do Delta da Parnaíba (UFDPAr)

Prof. Dr. José Jackson do Nascimento Costa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Laís Raiane Feitosa Melo
Faculdade Uninta Tianguá (UNINTA)

Há um tempo para cada propósito debaixo do céu

Eclesiastes 3:1

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 407992/2021-9.

Primeiramente sou grata a Deus, pela misericórdia e pelo discernimento para superar meus limites durante essa trajetória.

Aos meus pais, Alessandra e Francisco que foram meu alicerce e razão para lutar pelos meus sonhos. Obrigada por me ensinarem valores como honestidade, respeito e amor.

Ao meu padrinho, Francisco Costa, pela paciência e ensinamentos, muito desse trabalho aconteceu pela sua partilha, sou grata.

À minha madrinha, Bianca Silva, pelo seu apoio, conforto quando mais precisei, sou grata.

Ao meu amigo Francisco Freire, por todo o suporte, conselhos e parceria durante os dias de luta e os de glória, sou grata.

Ao Miguel Fernandes, por todas as contribuições e sugestões no decorrer deste trabalho.

À toda equipe do LABIREP pelo trabalho em equipe, que me acolheram desde o primeiro dia e nunca me deixaram sentir desamparada, fazer parte desse grupo permitiu que eu permanecesse firme até aqui, minha imensa gratidão.

Ao meu pai científico e orientador, Professor Dr. José Roberto Viana que não mediu esforços para transmitir toda a sua experiência, de forma humanizada, durante o desenvolvimento dessa pesquisa. Seu apoio, incentivo, sugestões, críticas e,

principalmente, sua paciência foram aspectos cruciais durante minha trajetória. Você é um exemplo de ser humano e profissional que inspira. Sempre será uma honra trabalhar com você. Gratidão por absolutamente tudo.

À professora e Coorientadora Dra. Valdevane Rocha Araújo, por me acompanhar durante a graduação e iniciação científica. Obrigada por ter me dado seu voto de confiança, os quais possibilitaram o início da minha jornada na pós-graduação. Serei sempre grata!

Ao professor Dr. José Jackson do Nascimento Costa, pelo apoio e valiosas contribuições e, sobretudo, pelas lições de encorajamento e partilha de conhecimento, boa vontade e leveza em tudo que se propõe.

À Prof. Dra. Laís Raiane Feitosa Melo por ter gentilmente aceito o convite para participar da banca de defesa desta dissertação e pela disponibilidade em contribuir para o engrandecimento deste trabalho.

À Universidade Federal do Ceará e ao programa de pós-graduação em biotecnologia, pela oportunidade oferecida.

Ao Núcleo de Biotecnologia de Sobral (NUBIS) pela disponibilidade de equipamentos e por todo o apoio técnico.

Agradeço também a todos os funcionários da UFC – *Campus Sobral*, pela disponibilidade, carinho e atenção.

Ao Laboratório de Bioquímica Gênica (LABIEX) da UECE por todos os ensinamentos durante meus 3 anos de iniciação científica e parceria em mais uma etapa da minha vida, em especial a coordenadora Dra. Vânia Marilande Ceccatto.

Agradeço, por fim, a todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização do meu propósito, sem vocês não seria possível.

RESUMO

A biotécnica de cultivo *in vitro* (CIV) de folículos ovarianos pré-antrais tem se destacado pela possibilidade proporcionar crescimento e desenvolvimento de folículos pré-antrais. Uma das principais limitações do CIV de folículos ovarianos é a formação em excesso das espécies reativas de oxigênio (EROS) que ocasionam o estresse oxidativo (EO). Com intuito de contornar os efeitos ocasionados pelo EO no CIV, adição de substâncias antioxidantes tem chamado atenção. Diante disso, o presente estudo avaliou os efeitos da Punicalagina na ativação, crescimento, sobrevivência folicular, densidade de células do estroma, conteúdo de colágeno em tecido ovariano bovino, bem como os níveis de RNAm para superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), peroxirredoxina 6 (PRDX6), fator nuclear eritróide 2 (NRF2) e análise bioquímica para quantificação da atividade antioxidante das enzimas CAT, SOD, GPX e o nível de tiol pelo método de Bradford. Para tal, fragmentos do córtex ovarianos (3x3x1 mm) foram fixados em paraformaldeído a 4% (controle não cultivado) ou cultivados *in vitro* em 500 µL de meio controle (α -MEM⁺) sozinho ou suplementado com 1, 10 ou 100 µM de Punicalagina a 38,5°C com 5% de CO₂ durante 6 dias, sendo realizado a troca do meio parcial (60%) a cada 2 dias de cultivo. A análise estatística foi realizando através do software GraphPad Prisma (9.0), a porcentagem de folículos primordiais e em desenvolvimento, bem como de folículos normais ou degenerados, foi analisada pelo teste de Qui-quadrado. Os dados relativos à densidade das células estromais, à atividade das enzimas antioxidantes e à expressão do mRNA foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn. As diferenças foram estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$. As análises dos resultados revelaram que as concentrações de 10 ou 100 µM de Punicalagina apresentaram taxas mais altas de folículos normais em comparação com o grupo controle. Além disso, houve aumento no número de folículos em crescimento quando comparado ao grupo controle não cultivado. No que diz respeito à densidade das células estromais, a presença de 100 µM de Punicalagina no meio de cultura manteve a densidade destas células semelhante aquelas observadas nos tecidos não cultivados. A MEC apresentou diminuição das fibras colágenas no meio de cultura suplementado com 1 ou 100 µM de Punicalagina em comparação ao grupo controle

não cultivado, por outro lado a concentração de 10 μM manteve as fibras colágenas nos tecidos cultivados. Tecidos cultivados na presença de Punicalagina 10 μM também apresentaram níveis elevados de mRNA para NRF2, *GPX1* e PRDX6 em comparação com tecidos tratados com Punicalagina 1 ou 100 μM . Quanto à expressão dos níveis proteicos, os fragmentos cultivados com Punicalagina 10 μM registraram maiores níveis de tiol, além de maior atividade das enzimas SOD, CAT e GPX em comparação ao grupo controle. Em resumo, a suplementação com Punicalagina em concentrações específicas teve efeitos na morfologia e desenvolvimento folicular, densidade celular do estroma, MEC, expressão de mRNA e proteínas antioxidantes em tecido ovariano bovino cultivados *in vitro* por seis dias.

Palavras-chave: Punicalagina; Cultivo *in vitro*; Estresse oxidativo; Folículos; Antioxidante; Bovino

ABSTRACT

The biotechnique of *in vitro* culture (IVC) of pre-antral ovarian follicles has stood out for its ability to provide growth and development of pre-antral follicles. One of the main limitations of IVC of ovarian follicles is the excessive formation of reactive oxygen species (ROS) which cause oxidative stress (OS). In order to counteract the effects of OES on IVC, the addition of antioxidant substances has attracted attention. Therefore, this study evaluated the effects of Punicalagin on activation, growth, follicular survival, stromal cell density, collagen content in bovine ovarian tissue, as well as mRNA levels for superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), peroxiredoxin 6 (PRDX6), nuclear factor erythroid 2 (NRF2) and biochemical analysis to quantify the antioxidant activity of the enzymes CAT, SOD, GPX and the thiol level using the Bradford method. For this purpose, fragments of ovarian cortex (3x3x1 mm) were fixed in 4% paraformaldehyde (uncultured control) or cultured *in vitro* in 500 μ L of control medium (α -MEM⁺) alone or supplemented with 1, 10 or 100 μ M Punicalagin at 38.5°C with 5% CO₂ for 6 days, the partial medium (60%) was changed every 2 days of culture. Statistical analysis was carried out using GraphPad Prisma (9.0) software, and the percentage of primordial and developing follicles, as well as normal or degenerated follicles, was analyzed using the Chi-square test. Analysis of the results revealed that the 10 or 100 μ M concentrations of Punicalagin showed higher rates of normal follicles compared to the control group. In addition, there was an increase in the number of growing follicles when compared to the uncultured control group. With regard to the density of stromal cells, the presence of 100 μ M Punicalagin in the culture medium kept the density of these cells similar to those observed in uncultured tissues. The ECM showed a decrease in collagen fibers in the culture medium supplemented with 1 or 100 μ M Punicalagin compared to the non-cultured control group, while the concentration of 10 μ M maintained the collagen fibers in the cultured tissues. Tissues cultured in the presence of 10 μ M Punicalagin also showed high levels of mRNA for NRF2, GPX1 and PRDX6 compared to tissues treated with 1 or 100 μ M Punicalagin. As for the expression of protein levels, the fragments cultured with Punicalagin 10 μ M showed higher thiol levels, as well as greater activity of the enzymes SOD, CAT and GPX compared to the control group. In summary, supplementation with Punicalagin at

specific concentrations had an effect on follicular morphology and development, stromal cell density, ECM, mRNA expression and antioxidant proteins in bovine ovarian tissue cultured *in vitro* for six days.

Keywords: Punicalagin; *In vitro* cultivation; Oxidative stress; Follicles; Antioxidant; Bovine

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração do ovário mamífero e suas principais estruturas	21
Figura 2 – Representação esquemática da foliculogênese incluindo folículos pré-antrais: primordiais, primários e secundários, e folículos antrais: terciários e pré-ovulatórios.....	22
Figura 3 – Moduladores da via de sinalização PI3K/Akt. RTK, receptor tirosina quinase; PI3K, fosfatidilinositol-3-quinase; PIP2, fosfatidilinositol-4-5-bifosfato; PIP3, fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato; PDK1, quinase 1 dependente de fosfatidilinositol; Akt, proteína quinase B; P, grupo fosfato; FOXO3, caixa de cabeçote O3; PTEN, fosfatase e homólogo da tensina.....	23
Figura 4 – Vias extrínseca e intrínseca da apoptótica. Bcl-2 e Bcl-XI; citocromo C; Bad; Bid; Bax; caspase 9; caspase 3	25
Figura 5 – Tipos de sistemas de cultivo <i>in vitro</i> de folículos ovarianos	27
Figura 6 – Representação esquemática da formação de um radical livre, caracterizado pela perda de um elétron a partir de um átomo de oxigênio	29
Figura 7 – Esquema ilustrativo da via de sinalização Nrf2/Keap1	31
Figura 8 – Diagrama: Ação integrada dos diferentes mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos	33
Figura 9 – Fórmula química da Punicalagina	36
Figura 10 – Mecanismos de ação antioxidantes da Punicalagina.....	38

CAPÍTULO 1

Figure 1 – Percentages of morphologically normal follicles before and after culture of ovarian tissues in control medium alone or supplemented with 1, 10 and 100 μ M Punicalagin. a-b show significant difference, for six days ($P \leq 0,05$)	53
---	----

Figure 2 – Representative images of sections of bovine ovarian tissue showing morphologically normal (a-c) and degenerate (d-f) follicles from different categories stained with hematoxylin and eosin. Normal primordial follicles (a) and degenerate (d); normal (b) and degenerate (e) primary; normal (c) and secondary degenerate (f). Granulosa cells (GC); oocyte (O); oocyte nucleus (N). Scale bar: 100 μm 54

Figure 3 – Percentages of primordial follicles (A) and developing follicles (B) in uncultured tissues and in tissues cultured for 6 days in control medium alone or supplemented with 1, 10 or 100 μM Punicalagin (PU). a-b (lower case) represents significant differences in the percentages of primordial follicles. A-B (upper case) represents significant differences in the percentages of developing follicles ($P \leq 0,05$)55

Figure 4 – Stromal cell density in uncultured tissues and in tissues cultured for 6 days in control medium alone or supplemented with 1, 10 and 100 μM in Punicalagin (PU). * significant difference between uncultured and cultured tissues ($P \leq 0,05$)56

Figure 5 – Representative images of stromal cells marked by hematoxylin and eosin staining and evaluated 10 fields per image. Fresh control (a); MEM (b); 1 μM (c); 10 μM (d); 100 μM Punicalagin (e). Scale bar: 100 μm56

Figure 6 – Collagen percentages in uncultured tissues and in tissues cultured for 6 days in control medium alone or supplemented with 1, 10 or 100 μM Punicalagin (PU). * indicates treatments that differed significantly from uncultured control ($p \leq 0,05$) ...57

Figure 7– Representative images of collagen fibers labeled by a red picosirius stain and observed under optical microscopy (400x). Fresh control (a); MEM (b); 1 μM (c); 10 μM (d); 100 μM Punicalagin (e). The black arrow shows an uncolored follicular area. Scale bar: 100 μm 58

Figure 8 – Levels of mRNA for SOD (A), NRF2 (B), GPX (C), CAT (D) and PRDX (E) in ovarian tissues after *in vitro* culture for 6 days in $\alpha\text{-MEM}^+$ alone or supplemented

with 1.0µM, 10µM or 100µM Punicalagin (PU). a, b: indicate significant difference between treatments ($p \leq 0,05$)59

Figure 9 – Levels of thiol (A) and activity of CAT (B), SOD (C), and GPX (D) in tissues cultured in α -MEM⁺ alone or supplemented with 1.0µM 10µM or 100µM Punicalagin (PU). a, b different lower case letters indicate significant difference between treatments ($p \leq 0,05$)60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tipos de meio de cultivo de acordo com método de cultivo e espécie.....28

Tabela 2 – Suplementação utilizada no meio de cultivo base durante o cultivo *in situ* de tecido ovariano.....29

CAPÍTULO 1

Table 1 – Primer pairs used for real-time PCR.....50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt	Proteína quinase B
ANOVA	Análise de Variância
ARE	Elemento de resposta antioxidante
ATP	Adenosina trifosfato
BAD	Antagonista morte celular da Bcl-2
BAX	Associada proteína x da Bcl2-2
Bcl-2	Célula B de linfoma
BID	BH3- Agonista de domínio interativo.
BIM	Mediador interativo Bcl-2
BSA	Albumina Sérica Bovina
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAT	Catalase
CUL- 3	Culina-3
DMEM	Meio Eagle modificado Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EO	Estresse oxidativo
EpRE	Elemento de resposta eletrofílica
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FOXO3	Proteína humana codificadora de gene
GAP	Junção comunicante
Gcs	Células da granulosa
GDF9	Fator de diferenciação de crescimento-9
GPX1	Glutathione Peroxidase 1
GR	Glutathione redutase
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione oxidase
HO-1	Heme oxigenase
ITS	Insulina, Transferrina e Selênio
Keap1	Proteína 1 associada a ECH semelhante a Kelch

Kit	Kit ligante
McCoy	Meio base de McCoy
MOIFOPA	Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais
mRNA	RNA mensageiro
mTORC-1	Alvo Mamífero do Complexo Rapamicina 1
NQO1	Quinona Desidrogenase
Nrf2	Fator nuclear eritroide 2
OCDE/FAO	Organização para cooperação e desenvolvimento econômico da Agricultural Outlook
P	Potássio
PARP	poli-ribose polimerase
PBS	Phosphatebuffered saline (Tampão fosfato salino)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Ph	Potencial hidrogeniônico
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PRDX6	Peroxirredoxina 6
PTEN	Homólogo de fosfatase e tensina
PU	Punicalagina
RNA	Ácido ribonucleico
sMAF	Fibrossarcoma aponeurótico de músculo pequeno
SOD	Superóxido dismutase
TCM199	Meio de cultivo de tecidos 199
TNX	Tioredoxina-1
TN α	Fator de necrose tumoral – α
UFC	Universidade Federal do Ceará
UV	Ultravioleta
α -MEM	Meio essencial mínimo alfa
α -MEM+	Meio essencial mínimo alfa suplementado

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor que
>	Maior que
©	Copyright
®	Marca Registrada
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
Cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
G	Gramma
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
M	Molar
Mg	Miligrama
Mm	Milimolar
Mm	Milímetro
Ng	Nanograma
Nm	Nanômetro
Nm	Nanomolar
O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
°C	Grau Celsius
OH	Hidroxila
PM	Peso molecular

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	19
2.	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	Estrutura e função ovariana	21
2.2	Crescimento e desenvolvimento folicular em mamíferos	22
2.3	Cultivo <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais	26
2.4	Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo durante o cultivo <i>in vitro</i> de folículos ovarianos	29
2.5	Antioxidantes na suplementação de meios de cultivo de folículos ovarianos pré antrais	32
2.6	Punicalagina: aspectos químicos e mecanismo de ação antioxidante	36
3	JUSTIFICATIVA	40
4	HIPÓTESES	41
5	OBJETIVOS	42
5.1	Objetivo geral	42
5.2	Objetivos específicos	42
6	CAPÍTULO 1: Effect of Punicalagin on growth, viability, mRNA expression and antioxidant enzymes during <i>in vitro</i> culture of bovine ovarian tissue	43
7	CONCLUSÕES GERAIS	71
8	PERSPECTIVAS	72
	REFERÊNCIAS	73

1. INTRODUÇÃO

O Brasil detém o segundo maior rebanho bovino do mundo, sendo um dos principais exportadores mundiais de carne bovina. A bovinocultura apresenta impacto direto na conjuntura socioeconômica e nutricional, além de contribuir com a disponibilização de material genético voltado às pesquisas na área de reprodução animal (EMBRAPA, 2022). A Organização das Nações Unidas (ONU) estima que, dos 7,1 bilhões de habitantes, até 2050 a população mundial passará a 9,7 bilhões. Logo, faz-se necessária a realização de estudos que promovam o desenvolvimento e o aprimoramento de biotécnicas que garantam uma maior rapidez na reprodução de animais com elevado padrão genético, o que pode promover importantes benefícios econômicos, aumentando, ainda mais, a participação brasileira no mercado pecuarista internacional.

O cultivo *in vitro* baseia-se na produção *in vitro* de embriões a partir de oócitos coletados de folículos antrais e já é amplamente aplicada em rebanhos bovinos. No entanto, para a implementação do uso de folículos pré-antrais como fonte de oócitos, faz-se necessária uma melhoria expressiva dos sistemas de cultivo *in vitro* para a obtenção de oócitos competentes (ROSSETTO *et al.*, 2011), pois até o momento, os folículos ovarianos pré-antrais bovinos foram isolados e cultivados apenas até a fase de folículo antral (ROSSETTO *et al.*, 2012), somente a espécie murina alcançou os resultados mais promissores com nascimento de descendentes vivos (EPPIG, SCHROEDER, 1989; YAMASHIRO *et al.*, 2018). Para isso, a biotécnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA) tem se destacado em razão da possibilidade de recuperar um número significativo de oócitos a partir de folículos pré-antrais em espécies domésticas, bem como fornece uma vasta quantidade de oócitos aptos para serem maturados e fertilizados *in vitro* (BERGAMO *et al.*, 2022; LIMA; SILVA, 2018).

Um dos principais fatores limitantes do desenvolvimento folicular *in vitro* é o excessivo aumento intracelular de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). Sabendo disso, durante o cultivo *in vitro*, altas concentrações de oxigênio podem resultar no envelhecimento precoce dos folículos cultivados, em razão do aumento da produção de EROs (LEN *et al.*, 2019). Nessa perspectiva, o estresse oxidativo afeta a atividade mitocondrial, bem como a formação do fuso meiótico, a integridade do

material genético e a configuração cromossômica (HE *et al.*, 2016). Desta forma, esses eventos culminam no mau funcionamento do DNA, o que corrobora com a perda da integridade, seletividade de membranas e produção de ATP celular, desencadeando alterações estruturais e fisiológicas nos folículos cultivados *in vitro*. Além disso, a atividade das enzimas antioxidantes é afetada, o que também propicia a ação oxidativo (HORI *et al.*, 2013).

Com o intuito de contornar os efeitos deletérios ocasionados pelo estresse oxidativo em sistemas de cultivo folicular *in vitro*, a adição de substâncias antioxidantes aos meios de cultivo tem ganhado destaque, especialmente aquelas de origem natural, como os suplementos antioxidantes obtidos a partir de plantas (RASTELLI *et al.*, 2020). Nesse contexto, a *Punica Granatum*, popularmente conhecida como romã, tem sido objeto de estudo na investigação das funcionalidades dos compostos fenólicos (SAEED *et al.*, 2018). Posto isso, a casca da romã possui a maior quantidade de compostos fenólicos, de modo que a Punicalagina é o principal composto ativo que possui atividade antioxidante (SALGADO *et al.*, 2012).

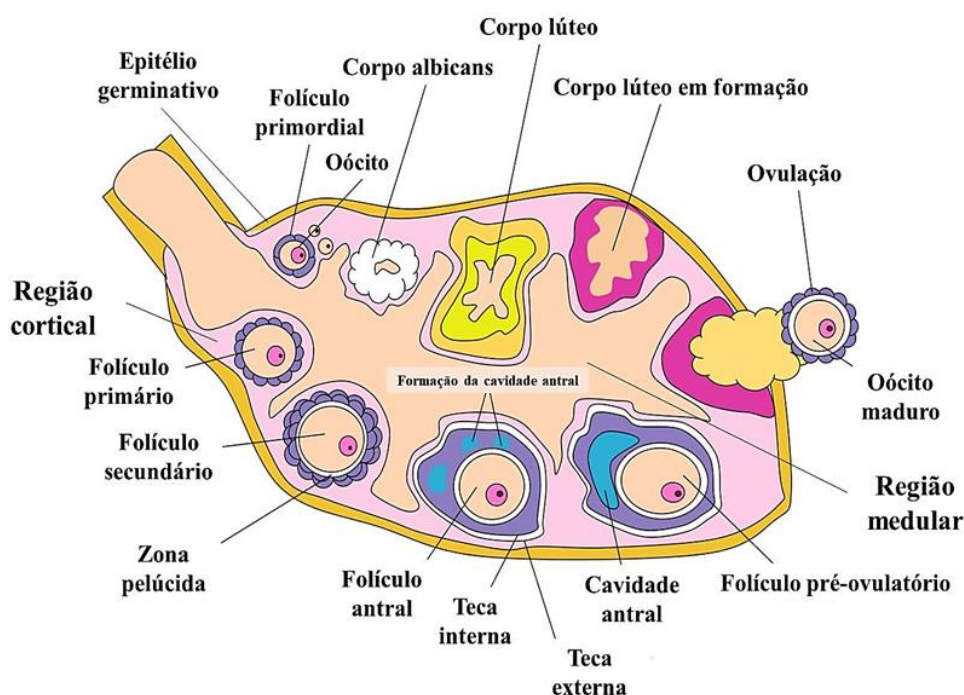
A Punicalagina é considerada o polifenol de maior peso molecular entre os elagitaninos da romã, apresentando potencial antioxidante que tem atraído cada vez mais atenção nos últimos anos (AL-KHAWALDE *et al.* 2022). Suas propriedades antioxidantes estão relacionadas aos grupos hidroxila polifenólicos presentes na molécula, os quais aumentam a atividade antioxidante. Desse modo, acredita-se que essa sua ação se dá pela eliminação de EROs, bem como pela sua ligação com íons metálicos (KULKARNI *et al.*, 2007). Nesse sentido, estudos mostram que a Punicalagina diminui a morte de células em trofoblasto de embriões humanos, pela expressão da proteína do linfoma de células B2 (Bcl-2), e a atividade negativa da proteína p53 (CHEN *et al.*, 2013). Além disso, também diminui a expressão de caspases 3 no cultivo de células do epitélio pigmentado da retina em condições estressantes (CLEMENTI *et al.*, 2021). Portanto, é de grande interesse esclarecer o efeito antioxidante da Punicalagina como suplemento no meio de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos bovinos, tendo em vista a lacuna existente na literatura acerca dos impactos desse composto no cultivo de folículos pré-antrais advindos da espécie bovina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estrutura e função ovariana

O ovário mamífero (Figura 1) é um órgão importante do sistema reprodutor feminino, tendo como funções básicas a secreção de hormônios (função endócrina) e a liberação de gametas (função gametogênica) (ARAÚJO *et al.*, 2014). Nos bovinos, os ovários apresentam aspecto ovalado/elíptico, com comprimento em torno de 3,0 a 4,5 cm, peso de 10 a 20 g e largura entre 1,5 a 2,0 cm. A região cortical dos ovários está localizada periféricamente, sendo constituída por um estroma rico em células do tecido conjuntivo e folículos ovarianos (BAHR, 2018). A região medular dos ovários, localizada internamente, é constituída por tecido conjuntivo rico em vasos sanguíneos e nervos. Os folículos representam a unidade morfofuncional do ovário, responsável por revestir, nutrir e armazenar os oócitos, desta forma corroborando para o seu desenvolvimento e ovulação (CORTVRINDT; SMITZ, 2001). Nos folículos, estão presentes milhares de oócitos, inclusos em sua maioria (cerca de 90%) em folículos pré-antrais que podem ser diferenciados entre si pelo número de células somáticas que os circundam (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

Figura 1- Ilustração do ovário mamífero e suas principais estruturas.

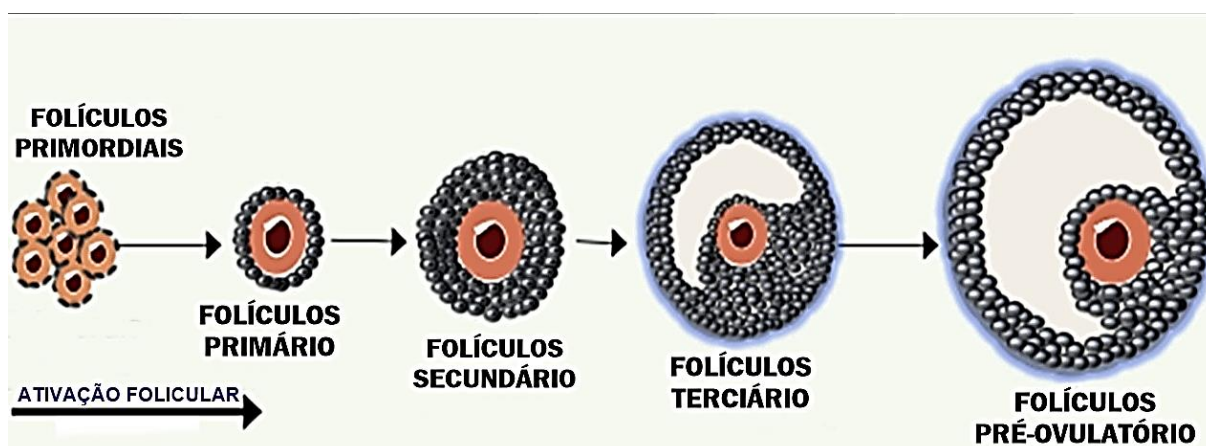


Fonte: Silverthorn, (2017).

2.2 Crescimento e desenvolvimento folicular em mamíferos

A foliculogênese é responsável pela formação, crescimento e maturação folicular, iniciando ainda na vida fetal (Figura 2). O desenvolvimento folicular caracteriza-se como um processo contínuo, iniciado pela formação de folículos primordiais que constitui o “*pool* ovariano” e durante a ativação e desenvolvimento passam pelos estágios de folículos primários, secundários, terciários e finalmente chegam ao estágio pré-ovulatórios, fase que termina com a ovulação do oócito maduro ou atresia folicular (ADONA *et al.*, 2012; MARTINS *et al.*, 2008). Dessa forma, os folículos ovarianos são denominados como complexos em fases transitórias possuindo um oócito circundado por células somáticas (células da granulosa e tecais) e são responsáveis por determinar o ciclo reprodutivo (SPITSCHAK; HOEFLICH, 2018; GERSHON; DEKEL, 2020).

Figura 2 - Representação esquemática da foliculogênese incluindo folículos pré-antrais: primordiais, primários e secundários, e folículos antrais: terciários e pré-ovulatórios.

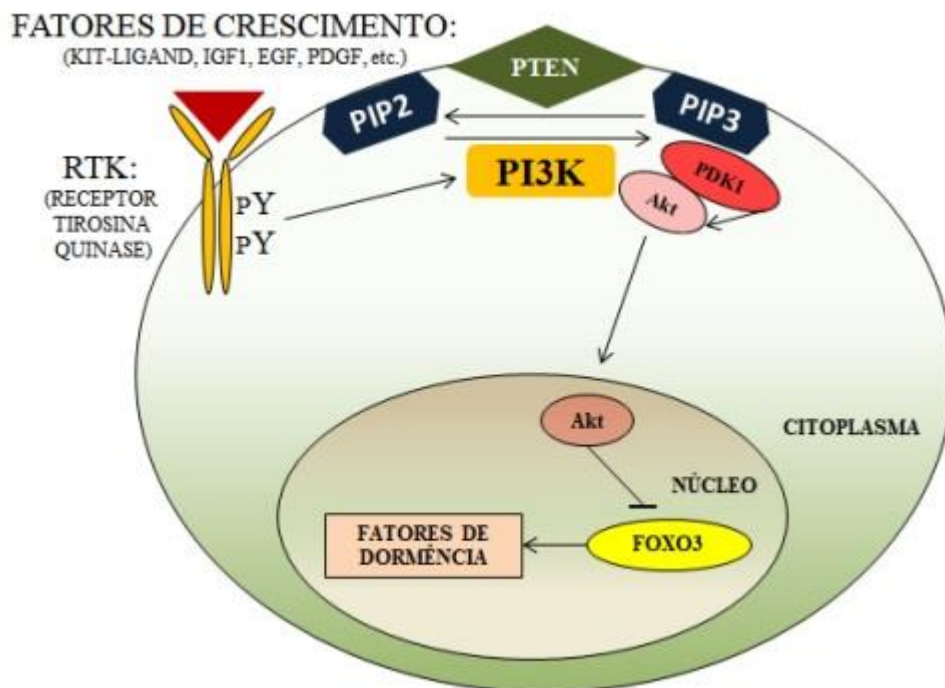


Fonte: Adaptado Telfer, Andersen (2021).

Nos bovinos, estima-se que a população folicular ovariana seja de aproximadamente 235.000 folículos por ovário. Os folículos primordiais representam 90% deste total, caracterizados por possuírem uma camada de células da pré-granulosa com formato pavimentoso (SILVA-SANTOS *et al.*, 2011). Ao deixarem a fase de quiescência, os folículos primordiais passam por um processo sequencial de crescimento e ativação, onde ocorre alterações bioquímicas e funcionais nas células foliculares que levam ao aumento da atividade metabólica e transcricional (ROSSETTO *et al.*, 2011). O processo de ativação folicular é regulado pela via de

sinalização PI3K-AKT (*fosfatidilinositol 3-quinase – proteína quinase B*), iniciada pela ativação do gene mTORC1 (Alvo Mamífero do Complexo Rapamicina 1) nas células da pré-granulosa dos folículos primordiais, resultando na proliferação e diferenciação em células cuboides. A diferenciação promovida por mTORC1 leva a expressão do KL (Kit Ligante), responsável pelo processo de crescimento oocitário e proliferação das células da granulosa, bem como a regulação positiva da secreção do receptor KIT (KILT), em que ambos atuam ativando a sinalização intra-oócito. Enquanto o antagonista PTEN (fosfatase lipídica) é um regulador negativo da PI3K responsável pela manutenção e dormência dos folículos (MAKKER *et al.*, 2023).

Figura 3: Moduladores da via de sinalização PI3K/Akt. RTK, receptor tirosina quinase; PI3K, fosfatidilinositol-3-quinase; PIP2, fosfatidilinositol-4-5-bifosfato; PIP3, fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato; PDK1, quinase 1 dependente de fosfatidilinositol; Akt, proteína quinase B; P, grupo fosfato; FOXO3, caixa de cabeçote O3; PTEN, fosfatase e homólogo da tensina.



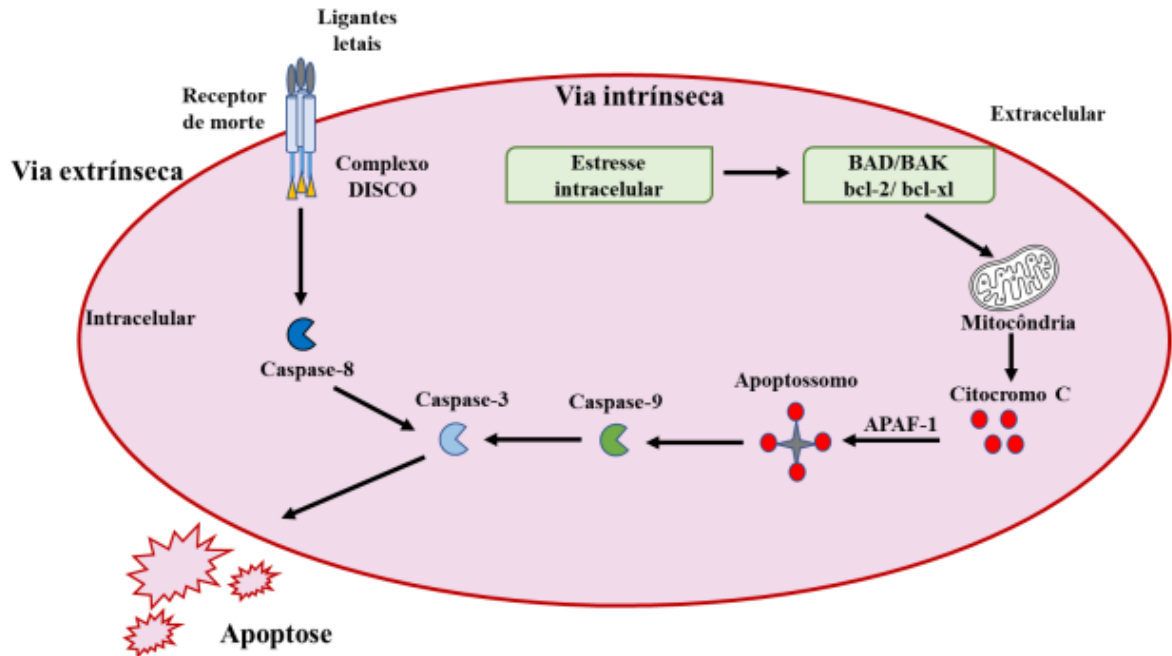
Fonte: Adaptado de Lee; Chang (2019)

A partir do estágio de folículo primário, as células da granulosa sofrem intensa multiplicação por mecanismos independentes de gonadotrofinas, originando os folículos secundários que são caracterizados pela presença de duas ou mais camadas de células da granulosa ao redor do oócitos. Sendo possível notar a formação de uma matriz extracelular a partir de glicoproteínas, denominada de zona pelúcida (ZP),

fundamental para a fertilização e pré-implantação do embrião. Concomitante ao surgimento da ZP, ocorre a formação das células da teca pela presença da diferenciação de células do estroma. As células da teca são importantes para esteroidogênese ovariana, pois protegem o folículo em desenvolvimento, além de dar suporte estrutural e vascular até a ovulação (QIU *et al.*, 2014). Devido ao acúmulo de secreção androgênica, bem como de água e sais minerais, há uma reorganização das células da granulosa, culminando com a formação de uma cavidade antral, caracterizado pela formação dos folículos terciários e, assim, a categoria de folículos antrais. Por fim, os folículos pré-ovulatórios, apresentam aumento na cavidade antral e um oócito em metáfase II, esse sendo o último estágio do desenvolvimento folicular (MORAIS *et al.*, 2019). Entretanto, apenas uma pequena parte (0,01%) é capaz de se desenvolver até a ovulação, sendo o restante (99,9%) perdido por atresia (FIGUEIREDO *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2008).

A atresia é um processo natural caracterizado pela reabsorção de um ou mais folículos ovarianos antes de atingirem a maturidade. Nos folículos, esse processo pode ocorrer através da via apoptótica ou do processo degenerativo da necrose. (CAVALCANTE *et al.*, 2019). A apoptose é a forma mais frequente de morte celular fisiológica, definida como uma morte celular programada dependente da síntese proteica, caracterizada por numerosos corpos apoptóticos e alterações histológicas como encolhimento celular, condensação do núcleo e fragmentação no DNA (CAROU *et al.*, 2015). O processo de apoptose pode ser ativado pela via extrínseca ou intrínseca (figura 4), dependente de caspases. A via intrínseca, é regulada principalmente pelas mitocôndrias, sendo mais estudado o mecanismo iniciado pela liberação do citocromo c mediado por estresse. Na célula viável as proteínas Bcl-2 e Bcl-xL estão localizadas na membrana mitocondrial e previnem a liberação do citocromo c (VITALE *et al.*, 2023). No entanto, durante uma situação de estresse, proteínas como a Bad, Bid, Bax e Bim estão localizadas no citosol e se translocam para dentro das mitocôndrias, onde induzem a liberação do citocromo c. O citocromo c vai induzir a formação do apoptossoma e ativar uma caspase iniciadora, caspase 9, que ativará a caspase 3 efetora. Esta é responsável pela clivagem de vários produtos denominados substratos de morte que ocasionam as alterações características de morte celular por apoptose (DESAGHER; MARTINO, 2000; TANG *et al.*, 2019).

Figura 4: Vias extrínseca e intrínseca da apoptótica. Bcl-2 e Bcl-Xl; citocromo C; Bad; Bid; Bax; caspase 9; caspase 3.



Fonte: Adaptado da tese de Barberino (2021).

A atresia folicular causada pela necrose, pode ocorrer através do estresse físico-químicos, isquemia, esgotamento da adenosina trifosfato (ATP) e insultos traumáticos, que levam a danos celulares irreversíveis (YEUNG *et al.*, 2017). Neste caso, as principais características são o aumento do volume celular, agregação da cromatina, perda da integridade da membrana plasmática que ocasionam ruptura celular. Durante esse processo, o conteúdo que é liberado do seu interior para o exterior e causa danos às células próximas, desencadeando uma reação inflamatória local, resultando em uma lesão celular irreversível (HU *et al.*, 2021).

Diante disso, a biotécnica de MOIFOPA visa resgatar esses folículos que seriam normalmente perdidos *in vivo*, desta forma, recuperando folículos e cultivo para o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais, tornando-os aptos a serem maturados e fertilizados (FIGUEIREDO *et al.*, 2007). No tocante ao cultivo *in vitro*, este tem um papel importante na MOIFOPA, onde é possível promover o crescimento e maturação dos folículos pré-antrais presentes no tecido ovariano, com a finalidade de realizar estudos fundamentados na foliculogênese inicial e nos fatores que

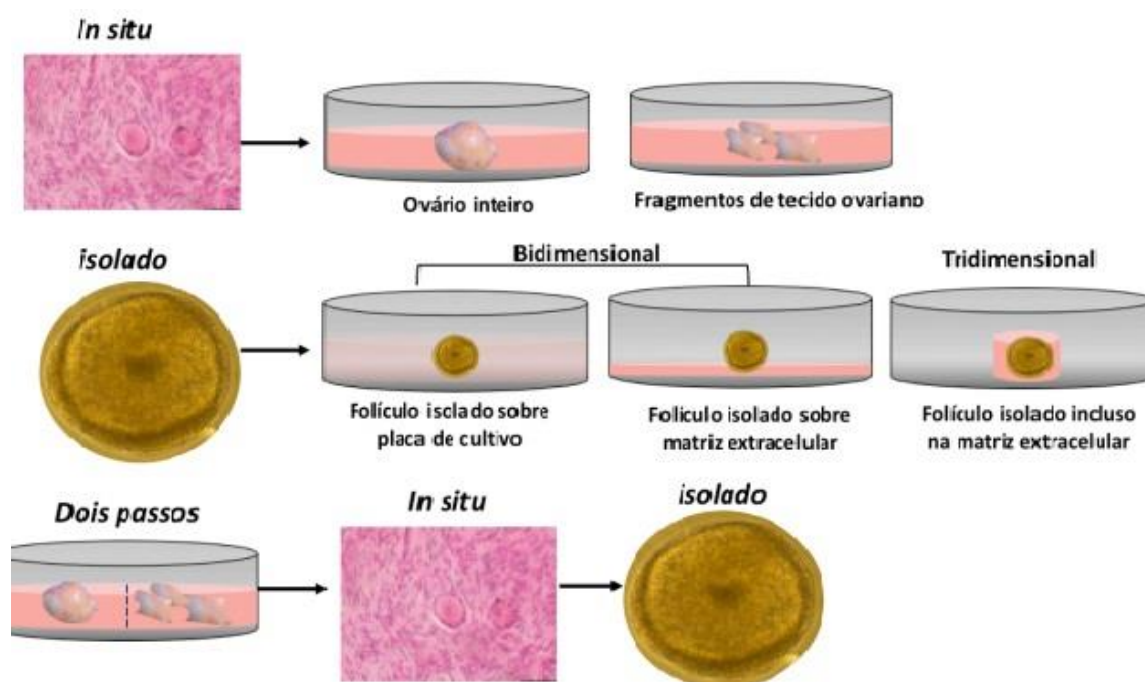
influenciam o desenvolvimento folicular. Visto que o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais de animais de maior porte ainda é baixo (SARAIVA *et al.*, 2010).

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

Na espécie bovina, a duração do desenvolvimento folicular é de aproximadamente 180 dias (RUSSE, 1983; MELLO *et al.*, 2013) e os folículos primordiais demoram em torno de 3 a 5 meses para atingir o estágio de folículos antrais, com grande parte desse tempo gasto nos estágios pré-antrais (WEBB *et al.* 2016). O desenvolvimento dos folículos antrais iniciais até o estágio pré-ovulatório que também é longo, em torno de 42 dias (BRITT, 1991, FORTUNE *et al.*, 2001), ocorrendo disparidade quando comparado a produção *in vitro* na espécie murinos, pois sua foliculogênese dura em cerca de 21 dias (LUSSIER; MATTON; DUFOUR, 1987; SILVA *et al.*, 2017). Esses dados indicam que para um período de cultivo *in vitro* de longo prazo é necessário promover um desenvolvimento folicular eficaz, desta forma, o controle rigoroso das condições de cultivo e a combinação específica de diferentes substâncias são necessários para melhoria da técnica (PAULINO *et al.*, 2022).

Atualmente, existem basicamente duas maneiras de cultivar folículos pré-antrais: 1) cultivo de fragmentos de tecido ovariano (*in situ*) ou 2) cultivo de folículos ovarianos isolados em placa ou sobre a matriz extracelular (MEC) no sistema bidirecional (2D) ou inclusos na matriz extracelular no sistema tridimensional (3D) conforme figura 5 (ARAÚJO *et al.*, 2014). Como também, pode ser realizado um cultivo em dois passos, onde primeiramente é realizado o cultivo *in situ*, que permite a ativação e o desenvolvimento de folículos primordiais até o estágio de secundário e posteriormente o cultivo isolado para o desenvolvimento até o estágio antral. Ambos os cultivos têm sido utilizados, com intuito de definir protocolos que permitam um melhor crescimento e maturação folicular (FIGUEIREDO LIMA, 2017).

Figura 5: Tipos de sistemas de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos.



Fonte: PAULINO (2022).

No cultivo *in situ*, os folículos pré-antrais permanecem inclusos no córtex de tecido ovariano, permitindo a manutenção da integridade estrutural dos folículos, bem como as interações entre as células foliculares e adjacentes, como as do estroma, da teca e da granulosa (AGUIAR *et al.*, 2016). Favorecendo de maneira significativa o crescimento folicular, visto que o ambiente nessas condições é semelhante ao ambiente no qual o folículo está inserido *in vivo*, evitando ainda a exposição prolongada das células ao meio externo e facilitando uma melhor perfusão do meio de cultivo para as células do tecido ovariano (ARAÚJO *et al.*, 2014). Já durante o cultivo de folículos isolados, os folículos pré-antrais devem ser desprendidos do tecido ovariano que o envolve (PAES *et al.*, 2016). Este tipo de cultivo tem a vantagem de possibilitar um acompanhamento individual durante o desenvolvimento folicular em condições *in vitro*. Além disso, em casos de atresia folicular durante o cultivo, as substâncias produzidas em decorrência deste processo, não influencia os outros folículos (MBEMYA *et al.*, 2018). O cultivo de folículos isolados pode ser feito no modelo bidimensional (2D) ou tridimensional (3D). No cultivo 2D o folículo cresce diretamente sobre a placa de cultivo ou monocamada de substrato, que pode ser

constituída por uma matriz extracelular ou componentes do estroma ovariano, incluindo células da granulosa e fibroblastos. No modelo 3D, o cultivo folicular é feito inserindo-se o folículo dentro do substrato, comumente uma matriz de hidrogel (ARAÚJO *et al.*, 2014). Apesar dos avanços nesses sistemas de cultivo, uma das principais limitações é a produção de estresse oxidativo ocasionado pelo aumento desordenado das EROS (HARDY *et al.*, 2021).

A eficiência do cultivo *in vitro* está relacionada à elaboração e aperfeiçoamento de um meio de cultivo que possibilite as condições necessárias ao desenvolvimento folicular. Esse meio é indispensável para a promoção do crescimento folicular sob condições de cultivo *in vitro* (BIZARRO-SILVA *et al.*, 2018). Desta forma, é imprescindível a escolha de um sistema de cultivo folicular *in vitro* eficiente e posteriormente, escolher o meio base utilizado (**Tabela 1**) e os suplementos para suprir as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais e assim manter a integridade das células foliculares e evitar processos degenerativos (MARINO *et al.*, 2019; SIMON LE *et al.*, 2020).

Tabela 1: Tipos de meio de cultivo de acordo com método de cultivo e espécie.

Método de cultivo	Meio de cultivo	Espécie	Autores
Folículos isolados	α -MEM	Caprino	Neto <i>et al.</i> (2020)
	McCoy	Bovino	Rosseto <i>et al.</i> (2012)
	TCM 199	Bovino	Azevedo <i>et al.</i> (2022)
	DMEM	Bovino	Liu <i>et al.</i> (2022)
Folículos <i>in situ</i>	α -MEM	Bovino	Silva <i>et al.</i> (2023)
		Caprino	Palomino <i>et al.</i> (2021)
		Equino	Gastal <i>et al.</i> (2019)

Fonte: Adaptado Costa, (2021).

Dentra a variedade de meios disponíveis, quando o assunto é o cultivo *in situ* o meio α -MEM se destaca, isso se dá pelo fato da sua composição apresentar alterações nas concentrações de aminoácidos que assemelham-se as proteicas de células de mamíferos, pois além de apresentar piruvato de sódio, contém os vinte e um aminoácidos essenciais e cinco vitaminas adicionais (JIMENEZ *et al.*, 2016; ARAÚJO *et al.*, 2015). Contudo, apesar do meio dispor de diversos fatores que corroborem para desenvolvimento folicular, ainda se faz necessário a adição de substâncias que sejam eficientes na sobrevivência e crescimento folicular, entre eles o antibióticos tampões, lipídios, proteínas, aminoácidos, vitaminas, bem como

hormônios e diversos fatores de crescimento (FIGUEIREDO *et al.*, 2008), conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2: Suplementação utilizada no meio de cultivo base durante o cultivo *in situ* de tecido ovariano.

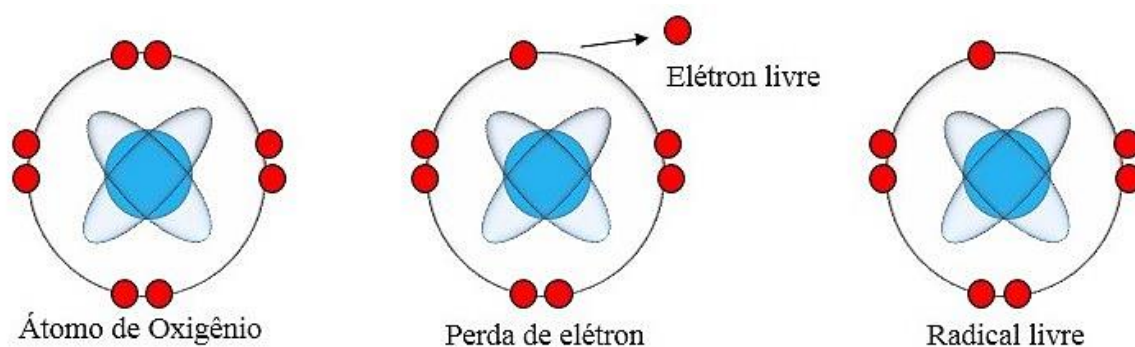
Suplementos do meio de cultivo <i>in situ</i>	Função	Autores
ITS	Antioxidante	Zhoheir <i>et al.</i> (2017)
Ácido ascórbico	Antioxidante	Bergamo <i>et al.</i> (2022)
Hipoxantina	Substrato energético	Passos <i>et al.</i> (2016)
Glutamina	Substrato energético	Jimenez <i>et al.</i> (2016)
BSA	Fonte proteica	Rodrigue <i>et al.</i> (2010)
Penicilina/Estreptomicina	Controle antimicrobiano	Molinario (2010)

Fonte: Adaptado Costa, (2021).

2.4. Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo durante o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos

Os radicais livres são formas moleculares caracterizadas pela perda do emparelhamento de um ou mais elétrons em sua estrutura. Essas moléculas, chamadas de espécies reativas, em contato com o oxigênio, formam as espécies reativas do oxigênio (EROs) (Figura 6). O desequilíbrio entre a produção e eliminação dessas espécies resulta no estresse oxidativo, podendo causar dano oxidativo potencial em células e tecidos (FILIPOVIC *et al.*, 2015; PETERS *et al.*, 2020). Desta forma, o estresse oxidativo é desencadeado pelo acúmulo de EROs nas células em níveis que excedem a capacidade antioxidante e de reparo celular, causando diretamente danos oxidativos a todas as biomoléculas do ambiente celular, incluindo proteínas, lipídios e DNA (YANG *et al.*, 2021).

Figura 6 - Representação esquemática da formação de um radical livre, caracterizado pela perda de um elétron a partir de um átomo de oxigênio.



Fonte: Vasconcelos (2020).

Em condições fisiológicas, a geração de EROs ocorre durante várias reações metabólicas celulares, mas isto é equilibrado por sistemas de defesa antioxidante das células (AGARWAL *et al.*, 2006). *In vivo*, antioxidantes enzimáticos (glutathione peroxidase, catalase e superóxido, dismutase) e não enzimáticos (Ácido ascórbico, glutathione e selênio) fornecem proteção para eliminar ou suprimir a formação de oxidantes e ajudar as células a reparar os danos causados pelas EROs. Porém, durante a cultura folicular *in vitro*, o manejo e a falta de mecanismos de defesa antioxidante geram grandes quantidades de oxigênio celular e conseqüentemente aumentam a produção de EROs (LINS *et al.*, 2017).

Em sistemas de cultura *in vitro*, os folículos são mantidos em um ambiente diferente do *In vivo* e requerem condições adequadas para sobreviver e se desenvolver (PAULINO *et al.*, 2022). Vários fatores estão associados ao estresse oxidativo *in vitro*, sendo muitas vezes causados por fatores como manipulação, exposição supra fisiológica de oxigênio (20%), alteração de pH, diferentes composições de meio e ausência de mecanismos fisiológicos de proteção (SILVA *et al.*, 2011). A produção em excesso de EROs leva a degeneração de células da granulosa e a diminuição da qualidade do folículo ovariano, podendo assim influenciar no desenvolvimento folicular e sucesso do cultivo *in vitro* (VON MENGDEN *et al.*, 2020). Além disso, considerando que em condições *in vitro*, os folículos estão expostos a níveis mais elevados de oxigênio e à falta de mecanismos fisiológicos de defesa contra EROs (TALEBI *et al.*, 2012), a ausência de uma combinação eficiente de antioxidantes no meio de cultura pode resultar em estresse oxidativo e comprometer o desenvolvimento folicular (PAES *et al.*, 2016).

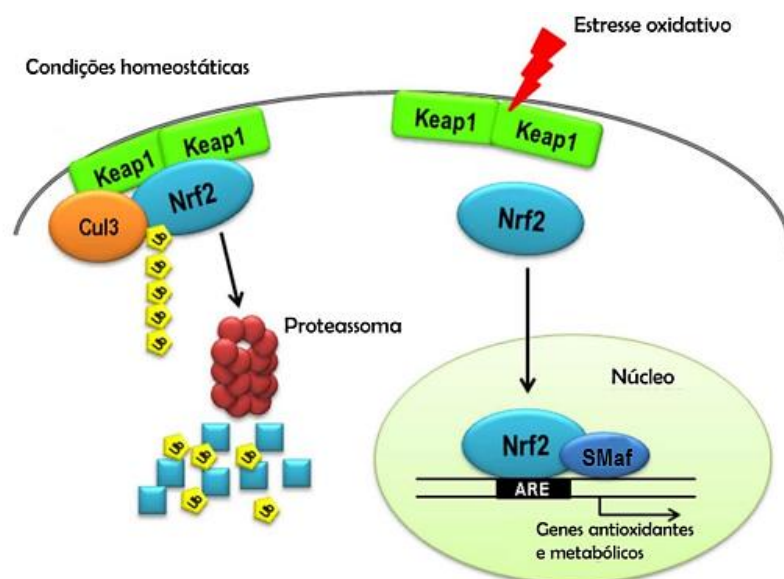
As mitocôndrias são as organelas responsáveis por produzir os radicais de oxigênio e o excesso de EROs, gera estresse oxidativo ocorrendo degeneração das mesmas. Além da inflamação acentuada influenciando diretamente na qualidade dos oócitos e das células dos cúmulos, pode ocorrer também desequilíbrio na produção de citocinas, fatores de crescimento e conseqüentemente induzir apoptose, resultando em atresia folicular (CECCONI *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2016).

Estudos demonstram que o estresse oxidativo influencia na comunicação entre oócitos e células da granulosa, causando diminuição da qualidade dos oócitos (CHAUBE *et al.*, 2014). Bem como, oxidação de moléculas intracelulares, como

aminoácidos, lipídios e ácidos nucléicos e compromete a viabilidade celular (CUI *et al.*, 2012). Além disso, pode induzir a apoptose nas células da granulosa e ocasionar diminuição nos níveis de estradiol podendo ocasionar atresia folicular (GHATEBI *et al.*, 2019; AGARWAL *et al.*, 2022). In vivo, para reduzir esses danos das EROS, os sistemas antioxidantes são encontrados naturalmente no fluido folicular e oviduto (LI; FOOTE; SIMKIN, 1993), e a capacidade antioxidante total é maior no fluido de foliculos, cujos oócitos tem maior capacidade de fertilização (OYAWOYE *et al.*, 2003).

A regulação da expressão de proteínas antioxidantes ocorre em resposta aos danos causados pelo estresse oxidativo contra lesões ou inflamação (SOHEL *et al.*, 2017). Essa resposta celular se dá pelo Fator Nuclear Eritroide (Nrf2), mediada pelas vesículas extracelulares, como os exossomos que atuam diretamente na regulação das funções biológicas. Em condições de estresse essas vesículas são ativadas e sinalizam as células receptoras, que alteram seus mecanismos de defesa e evitam a morte celular (ELDH *et al.*, 2010; XIAO *et al.*, 2023). Em condições homeostáticas Nrf2 é mantido inativo, sendo ligado ao seu inibidor endógeno Keap1 (Proteína 1 associada a ECH semelhante a Kelch), associado ao citoesqueleto. Nessas condições os níveis de Nrf2 são regulados principalmente via degradação por proteossoma, na qual a proteína Cul3 (Culina-3) responsável por marcar ubiquitinação do Nrf2 no proteossoma (MIMURA; ITOH, 2015; MA *et al.*, 2021).

Figura 7 - Esquema ilustrativo da via de sinalização Nrf2/Keap1



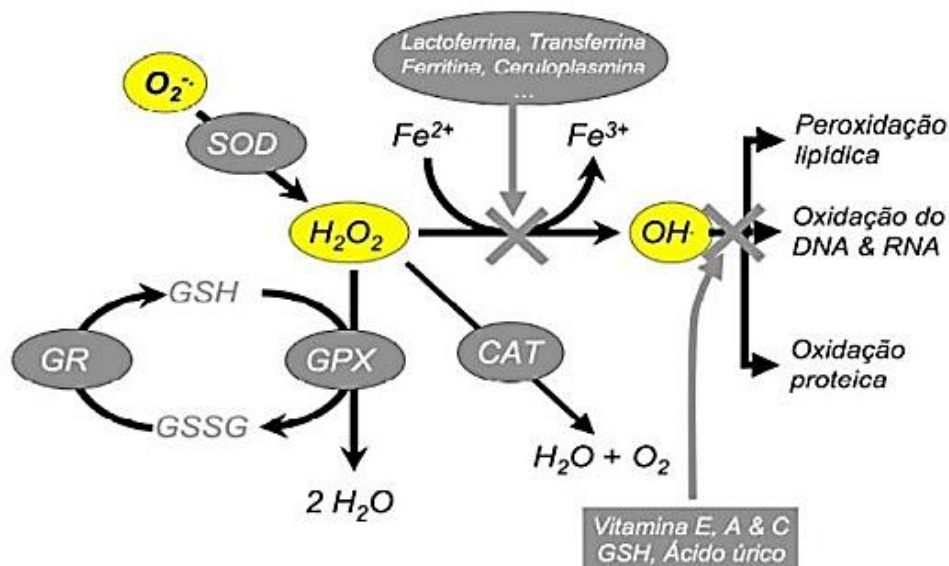
Fonte: Hahn; Oliveira; Bock (2017); adaptado de Bellezza *et al.*, (2018).

Sob condições de estresse oxidativo, resíduos reativos de cisteína são oxidados em Keap1, promovendo modificações na conformação de Keap1 e consequentemente, liberando o Nrf2. As moléculas de Nrf2 agem no núcleo celular associados às proteínas sMaf (fibrossarcoma aponeurótico de músculo pequeno). Esse complexo pode se ligar ao elemento de resposta antioxidante (ARE) ou ao elemento de resposta eletrofílica (EpRE), localizados na região promotora dos genes alvos. Dessa forma, o complexo Nrf2/sMaf, ao se ligar em ARE ou EpRE, promove o início do processo de transcrição dos genes, bem como aqueles relacionados à defesa antioxidante, incluindo peroxiredoxina-1 (PRDX1), catalase (CAT), superóxido dismutases (SOD) e tioredoxina-1 (TXN), sendo assim considerado, o regulador chave da resposta antioxidante no organismo, desempenhando papel crítico para proteção e sobrevivência celular (NITURE; KHATRI; JAISWAL, 2014; SOHEL *et al.*, 2017). Em condições de cultivo *in vitro*, ocorre aumento das EROS, por meio da exposição aos comprimentos de onda de luz, excesso de manipulação, substâncias que compõem o meio de cultivo e ausência da proteção antioxidante materna, pode afetar o desenvolvimento folicular e limitar o sucesso do cultivo (SOTO-HERAS, 2020). Portanto, o desequilíbrio na produção de EROs, podem ser contornadas com o uso de substâncias antioxidantes, que tem função de atenuar o estresse oxidativo (IDELCHIK *et al.*, 2016).

2.5. Antioxidantes na suplementação de meios de cultivo de folículos ovarianos pré antrais

Todos os organismos celulares possuem mecanismos de defesa antioxidantes que permitem ajudar as células a reparar os danos causados pela superprodução de radicais livres em situação de estresse oxidativo (WANG *et al.*, 2017). Os agentes antioxidantes caracterizam-se como substâncias que retardam ou previnem a oxidação de um substrato oxidável, pois atuam em condições normais convertendo EROs em água como método de bloqueio na formação de radicais livres (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). Como forma de combater a produção dos metabólitos provenientes de oxigênio (Figura 8), o organismo dispõe de dois tipos de sistemas antioxidantes: enzimáticos e não enzimáticos (GUPTA *et al.*, 2014).

Figura 8 - Ação integrada dos diferentes antioxidantes, enzimáticos e não enzimáticos (SOD – Superóxido Dismutase; GR – Glutathione Redutase; GSH e GSSG – Formas reduzida e oxidada da Glutathione; CAT – Catalase; DNA – Ácido Desoxirribonucleico; RNA – Ácido Ribonucleico).



Fonte: Ferreira *et al.*, (2008).

O sistema enzimático é representado pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), glutathione redutase (GR) e peroxidoredoxina (PPDX 6) (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Esses compostos atuam na prevenção da peroxidação lipídica e ao funcionamento adequado da célula (COMBELLES *et al.*, 2009; HALLIWELL, 2014). E o sistema não enzimático, compõe substâncias de baixo peso molecular oriundas de fontes exógenas ou naturais, dentre os quais podemos citar os carotenóides (como o β -caroteno), tocoferóis (como o α -tocoferol), compostos fenólicos como flavonoides, poliflavonóides, ácidos fenólicos, ácido lipóico, taninos, ácido ascórbico (vitamina C), selênio, ubiquinonas (coenzima Q) e os extratos de plantas como classes de compostos com alta atividade antioxidante (MAIA, 2006; VASCONCELOS *et al.*, 2007; CUNHA *et al.*, 2016; BORGES, 2017).

Durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, as células implantam um sistema de defesa antioxidante baseado em componentes enzimáticos, dentre os quais, pode destacar a SOD, CAT, GPX1 e PRDX6 que operaram em conjunto, participando da defesa celular, ao desempenharem papel crítico na remoção dos produtos nocivos com vistas a equilibrar os níveis de EROS dentro dos limites

fisiológicos, motivo pela qual são utilizadas como indicadores de análise do nível de estresse oxidativo (LUSHCHAK, 2014; MENEGON *et al.*, 2016).

A SOD é responsável pelo papel de proteção do oócito durante sua fase de maturação, convertendo ânions superóxido em hidrogênio e água. SOD1 é responsável por neutralizar ânions superóxido no citoplasma dos oócitos (HE *et al.*, 2016). Curiosamente, a alta atividade de SOD no fluido folicular foi correlacionada com taxas mais baixas de fertilização em humanos. Os oócitos que não foram fertilizados apresentaram mais atividade de SOD do que aqueles cujos oócitos foram fertilizados (SUTTON, THOMPSON, 2003). Matzuk e colaboradores (1998), demonstraram que camundongos nulos para SOD1 tiveram fertilidade reduzida. Além disso, os mesmos autores completaram o transplante de ovários de camundongos pós-natais com deficiência de SOD. Esses camundongos apresentaram todos os estágios da foliculogênese, incluindo corpos lúteos, e deram origem a descendentes viáveis (ZAIDI *et al.*, 2021).

A enzima CAT desempenha papel significativo na produção celular contra o dano oxidativo, encontrado nos peroxissomos (GLORIEUX; CALDERON, 2017). A CAT é considerada a principal enzima antioxidante no âmbito reprodutivo, pois age protegendo os oócitos contra EROS gerado pelos processos metabólicos fisiológicos, como a esteroidogênese do ovário (WANG *et al.*, 2017). Em bovinos, em modelo *in vitro* com ovários de gado leiteiro, Khan *et al.*, (2020) concluíram que o silenciamento de CAT induziu o acúmulo intracelular de EROS resultando em apoptose de células da granulosa (GCs) e parada do ciclo celular. Segundo os mesmos autores, da mesma forma, a comunicação da membrana mitocondrial e a biossíntese de hormônios esteroides em GCs também foram comprometidas, mostrando que a CAT evita a apoptose por afetar a biossíntese da regulação hormonal intracelular. A ação enzimática é dependente de concentrações elevadas de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que quando catalisado resulta na formação de água e oxigênio. Em baixas concentrações e na presença de um doador de hidrogênio adequado, como etanol, metanol, fenol e outros, a CAT age removendo H_2O_2 , oxidando seu substrato através de uma reação de peroxidação (ALI *et al.*, 2020).

A GPx-1, é uma enzima dependente de selênio que atua como catalisadora da redução do H_2O_2 ou hidroperóxidos orgânicos transformando-os em água e oxigênio

ou à álcoois correspondentes (GÓTH; RASS; PÁY, 2004; FLOHÉ; TOPPO; COZZA, 2011). Em mamíferos, a GPx-1 exerce um papel crucial na inibição da peroxidação lipídica e na proteção das células ao estresse oxidativo, podendo serem encontradas no citosol e nas mitocôndrias (MARGIS *et al.*, 2008; GILL, TUTEJA, 2010). Tal enzima já demonstrou papel importante de proteção aos ácidos graxos poli-insaturados de membrana (GATHWALA; AGGARWAL, 2016). Em estudo com modelo bovino, Lapointe *et al.* (2005) relatam que a GPx-1 está envolvida na desintoxicação de vários hidroperóxidos e que a modulação de sua expressão sugere que essa enzima atua como importante reguladora dos níveis de hidroperóxidos livres no oviduto em vacas. Além disso, Abedelahi *et al.* (2010) ao adicionarem selênio de sódio no meio de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais murinos observaram um aumento significativo na expressão de GPx-1 e conseqüentemente uma diminuição de EROs, potencializando a taxa de desenvolvimento folicular.

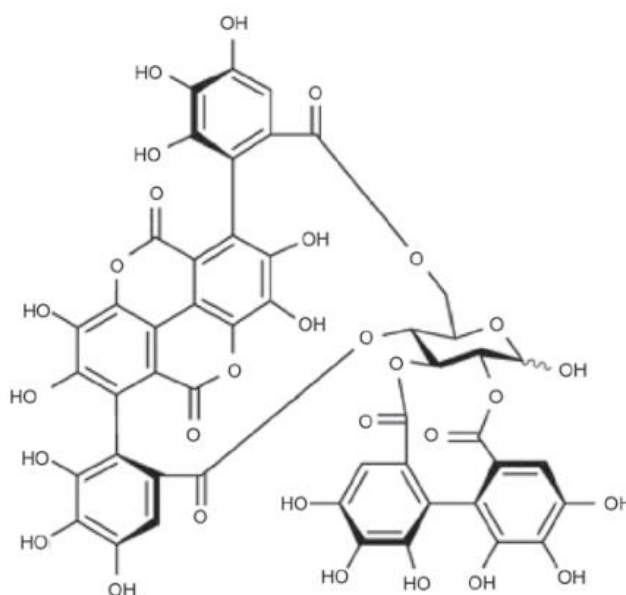
A PRDX 6 é a única das peroxiredoxinas que possui apenas um grupo cisteína, e que, portanto, utiliza a GPx para concluir sua reação peroxidática catalítica. Esta enzima atua na redução de H₂O₂, hidroperóxidos fosfolipídicos e hidroperóxidos de cadeia curta através da ação da GPx (MANEVICH *et al.*, 2004; FISHER *et al.*, 2016). Leyens *et al.* (2004) observaram que as células do cumulus de oócitos bovinos controlam a expressão de PRDX6 através das junções comunicante (gap) durante a maturação *in vitro*. Além disso relataram que GDF9 (Fator de diferenciação de crescimento-9) aumenta da expressão de PRDX6, confirmando assim o envolvimento desta enzima no processo de maturação oocitária. LU *et al.* (2018) em estudos com linhagens de células cancerosas (H1299, A549 e 293FT) concluíram que a PRDX6 é um regulador negativo essencial de sensibilidade à ferroptose, um tipo de morte celular programada ditada por dano oxidativo à membrana celular. Dessa forma, a composição dos meios de cultivo de folículo inclusos no tecido ovariano é um fator chave para promover o adequado desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais, uma vez que essa interrupção nos sistemas antioxidantes pode influenciar negativamente sobre a foliculogênese, maturação do oócito, ovulação, fertilização, implantação, desenvolvimento embrionário, bem como no sucesso da gravidez (WANG *et al.*, 2017; NUNES *et al.*, 2018).

Visando contornar os efeitos deletérios ocasionados pelas EROs durante o cultivo de células e tecidos, a utilização de antioxidantes vem sendo utilizada por possuírem uma grande variedade de moléculas sequestradoras de radicais livres contendo flavonóides, antocianinas, carotenoides, vitaminas e metabólicos endógenos, pois impedem as reações em cadeia dos radicais livres (SANTOS *et al.*, 2014). Muitos antioxidantes naturais podem ser encontrados em alimentos como frutas, vegetais cereais, flores, especiarias e ervas medicinais (XU *et al.*, 2018), sendo uma estratégia promissora na busca por fontes alternativas de suplementos com atividade antioxidante (IBRAHIM *et al.*, 2014; BARBERINO *et al.*, 2016; CALEJA *et al.*, 2016; AQUINO *et al.*, 2017).

2.6. Punicalagina: aspectos químicos e mecanismo de ação antioxidante

A Punicalagina (2,3-hexa-hidroxi-difenil-galagil-D-glucose) é um elagitanino presente na casca da romã (*Punica Granatum*), considerado o maior e mais importante polifenol da família dos elagitaninos (SALGADO *et al.*, 2012), atuando como composto ativo responsável pela maior parte da atividade antioxidante da romã, composto por flavonoides, elagitaninos, antocianidinas e minerais e com peso molecular de 1084,7 (BENCHAGRA, *et al.* 2021; YI LIU, *et al.* 2022). A estrutura química da Punicalagina (Figura 9), é possível observar grupos que são favoráveis para o processo de ação oxidante de radicais livres, visto que a presença da radical hidroxila nos compostos fenólicos torna estes compostos doadores de hidrogênio. Segundo Mendes *et al.* (2020) na reação de transferência de átomos de hidrogênio do antioxidante ao radical livre, é formado um radical antioxidante que é menos reativo que a molécula que foi reduzida, pois o elétron que fica desemparelhado se desloca ao longo do anel fenólico, tornando o composto mais estável. Os efeitos antioxidantes diretos dos compostos fenólicos da romã podem ser devido a presença de grupos funcionais hidroxila em torno de sua estrutura nuclear, os quais são potentes doadores de hidrogênio. Como também, por sua capacidade de formar ligações com íons metálicos (KULKARNIA; ARADHYAA; DIVAKARB, 2004; KULKARNI *et al.*, 2007).

Figura 9. Estrutura química da *Punicalagina*

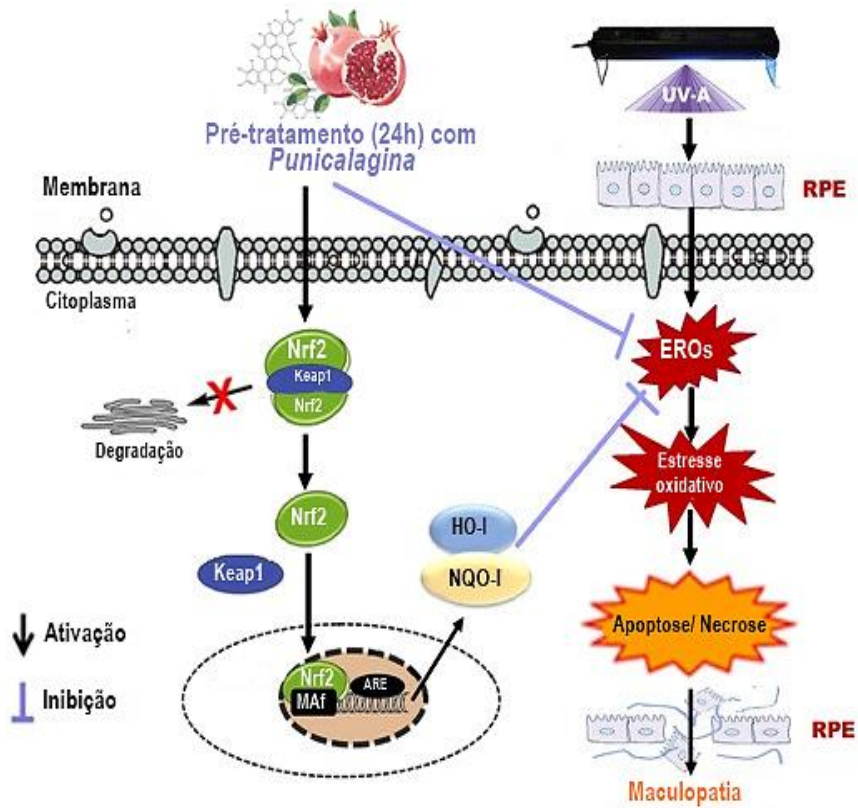


FONTE: TANG *et al.* (2017).

A Punicalagina é caracterizada por sua notável atividade antioxidante e eliminadora de radicais livres (AL-MAMARY *et al.*, 2021; ABDULHADI *et al.*, 2022; TAHERI *et al.*, 2017). Assim, este composto foi descrito pela sua poderosa capacidade de eliminar EROs, o que pode estar associado à melhoria dos parâmetros antioxidantes como o aumento em importantes enzimas antioxidantes como CAT e SOD (HUSSEIN *et al.*, 2022; ZHANG *et al.*, 2022), GPX (FENG *et al.*, 2020) e GSH (YANPAR *et al.*, 2021). Dentre os diversos mecanismos de ação relativos a atividade antioxidante da Punicalagina, destaca-se sua interação com a via de sinalização Nrf2, estudos mostraram que o pré-tratamento com Punicalagina apresentou aumento da expressão de Nrf2 no núcleo celular de hepatócitos de camundongos (LUO *et al.*, 2019). Bem como, na linhagem celular RPE humana (ARPE-19), o pré-tratamento com Punicalagina aumentou os níveis intracelulares de mRNA e proteínas de Nrf2, bem como os níveis de seus antioxidantes a jusante HO-1 e NQO1 (CLEMENTI *et al.*, 2020). Consistente com esses resultados, Ye *et al.* (2019) também observaram que o pré-tratamento de cardiomiócitos com Punicalagina antes da indução do estresse oxidativo aumentou a translocação nuclear de Nrf2. A administração de Punicalagina em camundongos foi capaz de induzir a ativação do Nrf2, através do aumento da expressão dos genes alvo Nrf2 heme oxigenase-1 (HO-1). Estes dados indicaram a

importante implicação da sinalização Nrf2/HO-1 no papel protetor da Punicalagina contra o dano oxidativo.

Figura 10 – Mecanismo de ação antioxidantes da Punicalagina.



Fonte: Adaptado Clementi *et al.*, (2020).

Evidências também sugerem um efeito antiapoptótico da Punicalagina associado à redução do estresse oxidativo. Neste contexto, a Punicalagina preveniu a apoptose induzida por MTX no fígado de camundongos, como mostrado pela diminuição das expressões de Bax e caspase-3 e aumento das expressões de Bcl-2. Concomitantemente, foram observadas regulação positiva de importantes enzimas antioxidantes como SOD e CAT, aumento no conteúdo de GSH e diminuição nos níveis de MDA (importante marcador de peroxidação lipídica) (AL-KHAWALDE *et al.*, 2022). Em modelo de células HepG2 induzidas ao estresse oxidativo, também foi observado que a Punicalagina preveniu o colapso do potencial de membrana mitocondrial, manteve níveis adequados de produção de ATP, reduziu os níveis de caspase 3 clivada e PARP clivada, bem como preveniu a liberação de citocromo

translocação mitocondrial C e Bax (YAN *et al.*, 2016). A modulação da via Nrf2 pela Punicalagina também poderia ser proposta para explicar seus efeitos antiapoptóticos registrados em vários estudos. De facto, a translocação de Nrf2 pode provocar um aumento na transcrição do gene Bcl-2, o que se traduz num aumento dos níveis da proteína Bcl-2 e numa diminuição de Bax, com a consequente diminuição da apoptose e aumento da sobrevivência celular (VOMUND *et al.*, 2017).

3. JUSTIFICATIVA

A escolha da espécie bovina como modelo animal justifica-se pela grande importância econômica e social para o Brasil. Os bovinos representam uma fonte valiosa de carne e leite, sendo a bovinocultura uma das principais atividades da pecuária em diversas regiões do país. Além disso, a fácil obtenção de material biológico desta espécie, a partir de abatedouros locais, reduz o uso de animais vivos para pesquisa e aproveitamento de tecidos que seriam descartadas. A espécie bovina também é considerada como modelo animal devido a sua similaridade à fisiologia humana, em especial, o tempo para completar a foliculogênese.

A MOIFOPA vem contribuindo de forma significativa na maximização do potencial reprodutivo de fêmeas mamíferas, além de fornecer informações importantes que envolvem a biologia ovariana, como a elucidação dos mecanismos envolvidos na foliculogênese durante a fase pré-antral. Neste sentido, o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais tem contribuído para o entendimento dos mecanismos que regulam o desenvolvimento folicular. Entretanto, em ruminantes de grande porte, como os bovinos, os sistemas de cultivo *in vitro* ainda apresentam limitações, entre elas a produção acentuada de EROs que como consequência, ocasiona o estresse oxidativo o que compromete a qualidade folicular.

A superprodução de EROs durante o cultivo folicular *in vitro* traz danos ao desenvolvimento folicular *in vitro*. Estes danos, no entanto, podem ser amenizados pela suplementação de meios de cultivo com substâncias antioxidantes, que podem contribuir para o desenvolvimento folicular *in vitro*. Neste sentido, as adições de produtos naturais como os compostos ativos extraídos de plantas, por exemplo, surgem como uma excelente alternativa para potencializar a eficiência de tais processos.

Dessa forma, visando aprimorar os estudos na MOIFOPA, a Punicalagina se torna atraente para possível uso potencial na prevenção de distúrbios associados ao estresse oxidativo. Por sua vez, a originalidade do presente trabalho baseia-se no pioneirismo investigativo da influência da suplementação de Punicalagina no cultivo *in vitro* de tecido ovariano bovino cultivados por seis dias.

4. HIPÓTESES

- A adição de Punicalagina no meio de cultivo *in vitro* de tecido ovariano bovino promove ativação e desenvolvimento folicular mantendo a morfologia celular adequada, preservando a integridade da matriz e a densidade estromal.
- A adição de *Punicalagina* ao meio de cultivo *in vitro* de tecido ovariano bovino aumenta os níveis de RNAs mensageiros para *NRF2*, *SOD*, *CAT*, *PRDX6* e *GPX1*.
- A adição de Punicalagina ao meio de cultivo promove a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx e aumenta os níveis de Tiol no tecido ovariano bovino cultivado *in vitro*.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo geral

- Avaliar os efeitos antioxidantes da adição de diferentes concentrações (1, 10 ou 100 μM) de Punicalagina durante o cultivo *in vitro* de tecido ovariano bovino.

5.2. Objetivos específicos:

- Verificar o efeito da adição de diferentes concentrações de Punicalagina (1, 10 ou 100 μM) no cultivo *in vitro* de tecido ovariano bovino sobre a morfologia, ativação e desenvolvimento folicular e densidade celular do estroma.
- Quantificar os níveis de RNAs mensageiros para *NRF2*, *SOD*, *CAT*, *PRDX6* e *GPX1* no tecido ovariano bovino cultivados *in vitro* na presença de diferentes concentrações de Punicalagina.
- Quantificar a atividade das enzimas *SOD*, *CAT* e *GPX* e conteúdo de Tiol em tecido ovariano bovino cultivado *in vitro* na presença de diferentes concentrações de Punicalagina.

6. Capítulo 1

Efeito da Punicalagina no crescimento, viabilidade, expressão de mRNA e enzimas antioxidantes durante cultivo *in vitro* de tecido ovariano bovino.

(Effect of Punicalagin on growth, viability, mRNA expression and antioxidant enzymes during *in vitro* culture of bovine ovarian tissue).

Effect of Punicalagin on growth, viability, mRNA expression and antioxidant enzymes during *in vitro* culture of bovine ovarian tissue.

Vitória Santos Bezerra ^a; Francisco das Chagas Costa ^a; Francisco Freire Caetano Filho ^a; Miguel Fernandes de Lima Neto ^a; José Jackson do Nascimento Costa ^a; Valdevane Rocha Araújo ^b; José Roberto Viana Silva ^{a*}

^a Laboratory of Biotechnology and Physiology of Reproduction (LABIREP), Federal University of Ceará, Sobral, CE, Brazil.

^b Laboratory of Biochemistry and Gene Expression (LABIEX), Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil.

*Corresponding author: jrvsilva@ufc.br

Laboratory of Biotechnology and Physiology of Reproduction, Federal University of Ceara, Av. Maurocélío Rocha Ponte 100, Sobral - CE - Brazil. CEP 62041-040, Telefone/ Fax: +55 8836118000

Background: The overproduction of reactive oxygen species (ROS) during *in vitro* follicular culture causes damage to follicular development *in vitro*. The results of previous research have provided evidence that Punicalagin can attenuate the oxidative stress that occurs during the *in vitro* culture of cells.

Objectives: To evaluate the effects of Punicalagin (1, 10 and 100 μ M) on primordial follicle activation, survival and development, as well as on ovarian stromal cell density and collagen distribution in extracellular matrix after 6 days of *in vitro* culture. The effects of Punicalagin on mRNA levels for SOD, CAT, NRF2, GPX and PRDX and activity of the antioxidant enzymes were also investigated.

Methods: Methods: Bovine ovaries were fragmented (3x3x1) and cultured for 6 days in control medium alone or supplemented with different concentrations of Punicalagin (1, 10 or 100 μ M) in 24-well plates. The morphology and growth of the follicles were analyzed, as well as the density of the stromal cells, the collagen fibers in the

extracellular matrix, the mRNA levels for NRF2, SOD, CAT, PRDX and GPX, in addition to the thiol levels and the activity of SOD, CAT and GPX.

Main results: Punicalagin (1, 10 or 100 μM) increased the percentage of morphologically normal follicles, as well as of developing follicles in bovine ovarian tissue cultured *in vitro* for six days. The presence of 10 μM Punicalagin kept the percentage of collagen fiber in ovarian tissue similar to non-cultured tissue and increased the levels of thiol and activity of SOD, CAT and GPX enzymes.

Conclusions: Punicalagin (10 μM) promotes follicle viability and growth, activates antioxidant enzymes and maintains extracellular matrix integrity in *in vitro* cultured bovine ovarian tissues.

Keywords: Punicalagin, Preantral follicles, Ovarian tissue, *in vitro* culture, oxidative stress.

1. Introduction

The *in vitro* culture of preantral follicles enclosed in ovarian tissue represents a valuable tool to study early follicular development in different species of mammals (SILVA *et al.*, 2023; AGUIAR *et al.*, 2016). Although different ovarian tissue culture systems have been proposed, the occurrence of oxidative stress during culture period still remains an important factor associated with the low quality of *in vitro* cultured follicles (SIMON, *et al.*, 2020; SILVA, *et al.*, 2023). High levels of ROS affect mitochondrial activity and chromosome configuration, causing loss of membrane integrity and reduced ATP production (SREEDHAR, *et al.*, 2020; HE *et al.*, 2016). It can also affect the endogenous antioxidant defences of cells, such as the enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) and perirredoxin (PRDX) (CHEN *et al.*, 2020; HORI *et al.*, 2013). Thus, to improve follicular survival and development *in vitro* is necessary to control ROS rates in the cellular environment. In this sense, the addition of antioxidant substances of natural origin to culture media has been emphasised (KADERIDES *et al.*, 2021; SALGADO *et al.*, 2012). Oxidative stress and DNA damage affect the expression of genes that encode the extracellular matrix (ECM), making it difficult to restore cellular and tissue homeostasis (GROSBOIS *et al.*, 2023). Additionally, the stromal cells directly

influencing the activation of primordial follicles and differentiation of theca cells (SHENG *et al.*, 2022).

Punicalagin is a polyphenol commonly found in the peel of the pomegranate (*Punica Granatum*). Among its biological properties, it is high antioxidant activity (RAMLAGAN *et al.*, 2022; SEERAM *et al.*, 2004), mainly due to the hydroxylated polyphenolic groups present in the molecule. Some reports show that Punicalagin scavenges ROS and binds to metal ions (NAVALE *et al.*, 2023; KULKARNI *et al.*, 2007). Some studies show that Punicalagin reduces oxidative stress damage in rat testes (RAO *et al.*, 2016), reduces trophoblastic cell death *in vitro* (CHEN *et al.*, 2013), and reduces caspase 3 expression in cultured retinal pigmented epithelial cells under stress conditions (CLEMENTI *et al.*, 2021). In addition, Punicalagin inhibits lipid peroxidation and ROS generation in human bladder cancer cells (J82) under stress (BENCHAGRA *et al.*, 2021). Punicalagin also promotes an increase in progesterone secretion and 17 β -estradiol release in rabbit ovaries (PACKOVA *et al.*, 2015). However, the effects of Punicalagin on bovine preantral ovarian follicle development have not been investigated.

The aims of this study were to evaluate the effects of different concentrations of Punicalagin (1, 10 and 100 μ M) on primordial follicle activation, survival and development, as well as on ovarian stromal cell density and collagen distribution in extracellular matrix after 6 days of *in vitro* culture. In addition, the effects of Punicalagin on mRNA levels for SOD, CAT, NRF2, GPX and PRDX, as well as on the activity of the antioxidant enzymes SOD, CAT, GPx and on thiol levels in cultured tissues were investigated.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Unless otherwise noted, the chemicals and media used in this study were obtained from Sigma-Chemical (St Louis, MO USA).

2.2. Ovarian collection

Ovaries (n = 16) from adult cows were collected from a local slaughterhouse. Immediately after death, each pair of ovaries was washed in ethanol (70%) for

approximately 10 s, followed by two washes in 0.9% saline solution, at 4° C, supplemented with penicillin (100 µg / mL) and streptomycin (100 µg / ml). After washing, each pair of ovaries was individually transported to the laboratory in falcon tubes containing α -MEM at 4°C supplemented with penicillin (100 µg / ml) and streptomycin (100 µg / ml) within 1 hour. This study was approved and carried out in accordance with the rules and guidelines of the Ethics and Animal Welfare Committee of the Federal University of Ceará (N° 05/22).

2.3. *In vitro* culture of ovarian tissue

In the laboratory, under sterile conditions, the cortex of each pair of ovaries was dissected from the medullary tissue and cut into 32 fragments of approximately 3x3x1 mm in dissection medium composed of α -MEM supplemented with penicillin (100µg / ml) and streptomycin (100 µg / ml). For uncultured control, fragments taken at random were immediately fixed in paraformaldehyde (4 %) for 24 hours at 4°C for to evaluate follicular morphology and growth and ovarian stromal cell density. Other ovarian fragments were stored at -80°C for biochemical analysis of antioxidant enzymes or for PCR analysis. The remaining fragments were cultured for 6 days in 24-well plates. (TPP 92024, Europa, Zwitterland), containing 500 µl of culture medium. The control medium, labeled as α -MEM⁺, consisted of α -MEM (pH 7.2 - 7.4) supplemented with BSA (1.2 mg/mL), glutamine (2mM), hypoxanthine (2mM), penicillin / streptomycin (100µg / ml), ascorbic acid (50µg / ml). The fragments were randomly distributed and cultured in α -MEM⁺ alone or supplemented with 1.0, 10 or 100µM Punicalagin. Culture conditions were at 38.5°C with 5% CO₂. The culture medium was stabilized at 38.5°C for 4 hours before use, and every 2 days of culture, 60% of the medium was replaced with fresh medium. This experiment was repeated 5 times.

2.4. Morphological analyses and assessment of *in vitro* follicular growth

Uncultured and cultured fragments were fixed in paraformaldehyde (4%) for 24 hours, dehydrated in increasing concentrations of ethanol, cleared using xylene and embedded in paraffin and sectioned at thickness of 7 µm. At each 5th section, slides were mounted and stained with hematoxylin and eosin. Only preantral follicles in which oocytes had the nucleus evident in the section were analyzed to avoid double counting. For all analyzes, the examiner was blinded to the treatment groups. The analysis of

follicles was performed in all sections under an optical microscope (Nikon, Eclipse, TS 100, Japan) under 400x magnification. The follicular classification was based on the criteria described by Telfer *et al.* (2008). For the follicles to be categorized as morphologically normal, the oocyte had to be roughly circular surrounded by a pellucid zone, absence of pycnotic bodies and cytoplasmic retraction. In addition, the degree of organization of the surrounding granulosa cells was considered. Degenerate follicles were defined as those with a retracted oocyte, presence of a pycnotic nucleus and/or was surrounded by disorganized granulosa cells, detached from the basement membrane (CAVALCANTE *et al.*, 2019). The follicles were classified as primordial (oocyte surrounded by one layer of flattened granulosa cells), primary (oocyte surrounded by one layer of cubic granule cells) and secondary (oocytes surrounded by two or more complete layers of cells from the cubic granulosa), according to Figueiredo *et al.* (2008).

2.5. Evaluation of ovarian stromal cell density

The number of stromal cells was calculated in an area of 100 μm^2 in sections from uncultured and cultured tissues. For each treatment, ten fields from histological sections were evaluated in tissues from six different animals. The average number of stromal cells per field was calculated as described previously (CAVALCANTE *et al.*, 2019). All evaluations and measurements were performed by a single operator.

2.6. Analysis of collagen fibers in the extracellular matrix

In order to evaluate the collagen fibers in the extracellular matrix of the ovarian cortex, staining with Picrosirius Red (Abcam Kit) was performed following the methodology described by Rittié (2017). Briefly, 7 μm ovarian sections were dewaxed in xylene and incubated in Sirius Red solution (0.1%) for 1 hour at room temperature. Then, the excess dye was removed with acetic acid solution (0.5%) and the sections were then dehydrated and subjected to slide assembly with subsequent observation under an optical microscope (Nikon, Eclipse, TS 100, Japan) under 400x magnification. For each treatment, the percentage of the area occupied by collagen fibers in ten different fields was measured with the aid of a DS Cooled Camera Head DS-Ri1 coupled to a Nikon, Eclipse, TS 100, Japan) microscope and the images were

analyzed by Image J Software (Version 1.51p, 2017) with 400x magnification. Only the collagen fibers were marked in red with the picosirius staining, while the follicles remained uncolored (white). The analyzer software automatically excluded the circumference of the unstained follicles from the total area marked in red.

2.7. Expression of mRNA for *SOD*, *CAT*, *PRDX6*, *GPX1*, and *NRF2* in *in vitro* cultured ovarian tissues

Ovarian tissues cultured for 6 days in each treatment were collected and then stored at -80°C until extraction of total RNA for further analysis of the levels of mRNA for *SOD*, *CAT*, *PRDX6*, *NRF2* and *GPX1*. Total RNA extraction was performed using a Trizol® purification kit (Invitrogen, São Paulo, Brazil) in accordance with the manufacturer's instructions. To this end, 1 ml 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 applied to a mini-column provided in the kit. After binding of the RNA to the column, DNA digestion was performed using RNase-free DNase (340 K units/ml) for 15 min at room temperature. After washing the column three times in buffer solution, the 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, England). Before the reverse transcription reaction, samples of RNA were incubated for 5 min at 70°C and then cooled on ice. Reverse transcription was performed in a total volume of 20 μl composed of 10 μl of sample containing 1 mg of RNA, 4 μl reverse transcriptase buffer (Invitrogen), eight units RNAsin, 150 units of reverse transcriptase Superscript III, 0.036 U random primers, 10 mM dithiothreitol and 0.5 mM of each dNTP (Invitrogen). The mixture was incubated at 42.1°C for 1 h, subsequently at 80°C for 5 min, and finally stored at -20°C . The negative control was prepared under the same conditions but without the addition of reverse transcriptase. Quantification of mRNA was performed using SYBR Green. Each reaction in real-time (20 μl) contained 10 μl of SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK), 7.3 μl of ultrapure water, 1 μl of complementary DNA (cDNA) and 5 mM of each primer. The primers represented Table 1 were designed to perform amplification of

SOD, *CAT*, *GPX1*, *PRDX6*, *NRF2* and *GAPDH5*, according to table 1. The *GAPDH* (was used as a reference gene for normalization of mRNA expression, according to previous studies (COSTA, 2022). The specificity of each primer pair was confirmed by melting curve analysis of PCR products. The efficiency amplification for all genes was verified according to Pfaffl (2001). The thermal cycling profile for the first round of PCR was initial denaturation and activation of the polymerase for 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C, 30 s at 58 °C, and 30 s at 72 °C. The final extension was for 10 min at 72 °C. All reactions were performed in a Step One Plus instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The negative control was prepared under the same conditions but without the addition of cDNA. The $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method was used to transform the C_t values into mRNA expression levels (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). This analysis was repeated with four biological samples from each treatment.

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

Target gene	Primer sequence (5' → 3')	Sense (S), anti- sense(As)	Genbank accession N°
GAPDH	TGTTTGTGATGGGCGTGAACCA	S	GI:402744670
	ATGGCGCGTGGACAGTGGTCATA	As	
NRF2	GACCCAGTCCAACCTTTGTC	S	GI: 030494.1
	GACCCGGACTTACAGGTACT	As	
PRDX6	GCACCTCCTCTTACTTCCCG	S	GI: 59858298
	GATGCGGCCGATGGTAGTAT	As	
GPX1	AACGTAGCATCGCTCTGAGG	S	GI:156602645
	GATGCCCAAACCTGGTTGCAG	As	
CAT	AAGTTCTGCATCGCCACTCA	S	GI:402693375
	GGGGCCCTACTGTCAGACTA	As	

SOD1	GTGAACAACCTCAACGTCGC	S	GI: 31341527
	GGGTTCTCCACCACCGTTAG	As	

2.8. Biochemical analysis

Samples of ovarian tissues (100 mg/mL) were macerated using potassium phosphate buffer (KH₂PO₄ and K₂HPO₄; P9791 and P3786; Sigma-Aldrich; 1:9), pH 7.5. The ovary homogenates were centrifuged at 1500g for 10 min at 48 °C and the supernatant collected for use in the spectrophotometric assays described below, using quartz cuvettes (Genesis 10s UV-vis; Thermo Scientific), as described previously (ELLMAN, 1959). Data are expressed as the mean s.e.m. enzyme unit per milligram of protein (U/mg protein).

2.8.1. Total proteins (Bradford method)

The protein concentration was determined using the Bradford method (BRADFORD 1976). This method uses Coomassie blue (Quick start/Bradford; Catalogue N^o. 500–0205; Bio-Rad) to determine the total concentration of proteins in each extract sample. When it comes in contact with proteins, the Coomassie blue stain forms a complex and emits a blue luminescence. The absorbance is directly related to the protein concentration of the sample and was evaluated spectrophotometrically at a wave-length of 595 nm. The total protein concentration in samples was determined using a standard curve constructed using bovine albumin as a standard (0, 2.5, 5, 10, 15, 25, 35 and 50 mg mL), and was used to standardize the levels of pro-oxidants (thiol) and antioxidants (SOD, CAT and GPx), as described below.

2.8.2. Determination of levels of thiol in cultured tissues

Total thiol content was determined using 5,50–dithiobis 2-nitrobenzoic acid (DTNB; Dynamic D8130) as an index of reduced thiol. Thiol residues react with DTNB (10 mM), cleaving the disulfide bond to form 2-nitro-5-thiobenzoate anion (NTB2⁻) at a neutral pH. NTB2⁻ is quantified in a spectrophotometer by measuring absorbance at

412 nm, with results expressed as nMol of reduced DTNB per milligram of protein (TAKAHASHI *et al.*, 1978).

2.8.3. Activity of SOD, CAT and GPx enzymes in cultured tissues

The SOD activity was measured as the inhibition of adrenaline auto-oxidation (BANNISTER; CALABRESE, 1987). Adrenaline oxidation, in the presence of CAT in basic medium, leads to the formation of the O₂⁻ radical, which SOD reacts with, thus slowing ('inhibiting') the oxidation of adrenaline. The CAT solution (0.048 mg/ mL; c9322; Sigma-Aldrich) was prepared adding (7:3) to glycine buffer, pH 10.2 (Dinâmica, São Paulo, Brazil). Three different volumes (10, 20 or 40 mL) of ovarian fragment homogenate were then added to the solution and then adrenaline (0.218 mg / mL; E4260; Sigma-Aldrich) was added to start oxidation. Oxidation was measured at 480 nm every 10 s for 180 s. The CAT activity was measured as the consumption of H₂O₂ as a substrate at 240 nm (AEBI, 1984). A solution of H₂O₂ (152mL mL; PH09717RA; Exôdo Scientific, São Paulo, Brazil) and phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) was mixed in a quartz cuvette at room temperature, and then 50 mL of the ovary homogenate were added. Every 30 s, the consumption of H₂O₂ was measured twice.

The GPx activity was measured by NADPH oxidation. The NADPH is consumed by glutathione reductase (GR; G3664; Sigma-Aldrich) to convert GSSG to GSH. In the presence of H₂O₂, GPx oxidizes GSH to GSSG and reduces peroxides to alcohols and water. The consumption of NADPH is directly proportional to H₂O₂ consumption and, consequently, to GPx activity (FLOHE; GUNZLER 1984). The reaction was prepared by mixing 500 mL of Potassium Phosphate buffer (100 mM), which is composed of 13.6 g / L monobasic potassium phosphate (P0662; Sigma-Aldrich) plus 1.86 g L⁻¹ EDTA (5 mM; E4884; Sigma-Aldrich; pH 7.4) and 38 mg mL⁻¹ GR, 3 mg / mL GSH and 100 mL homogenate of ovarian tissue for 10 min at room temperature so that GPx cysteine could come into contact with GR and GSH. Ultimately, 100 mL NADPH and 120 s later, 100 mL H₂O₂ was added to the mixture, and the oxidation of NADPH, measured as a decrease in NADPH.

2.9. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software (9.0). The percentage of normal follicles and of follicles at different stages of development were evaluated by Chi-square test. Stromal cell density, collagen fiber distribution, levels of mRNA and activity of antioxidant enzyme were analyzed by ANOVA and Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's comparison test. Differences were considered statistically significant when $P \leq 0,05$.

3. Results

3.1. Effects of Punicalagin on follicular morphology after *in vitro* culture

Histological analysis demonstrated that ovarian cortical fragments cultured in all treatments showed a reduction in the percentage of normal follicles when compared with uncultured tissues ($P \leq 0,05$). Punicalagin (1, 10 or 100 μM), however, increased the percentage of morphologically normal follicles in bovine ovarian tissue cultured *in vitro* for six days when compared with tissues cultured in control medium alone (Figure 1). Tissues cultured with 10 or 100 μM Punicalagin had higher percentages of normal follicles than those cultured with 1 μM Punicalagin.

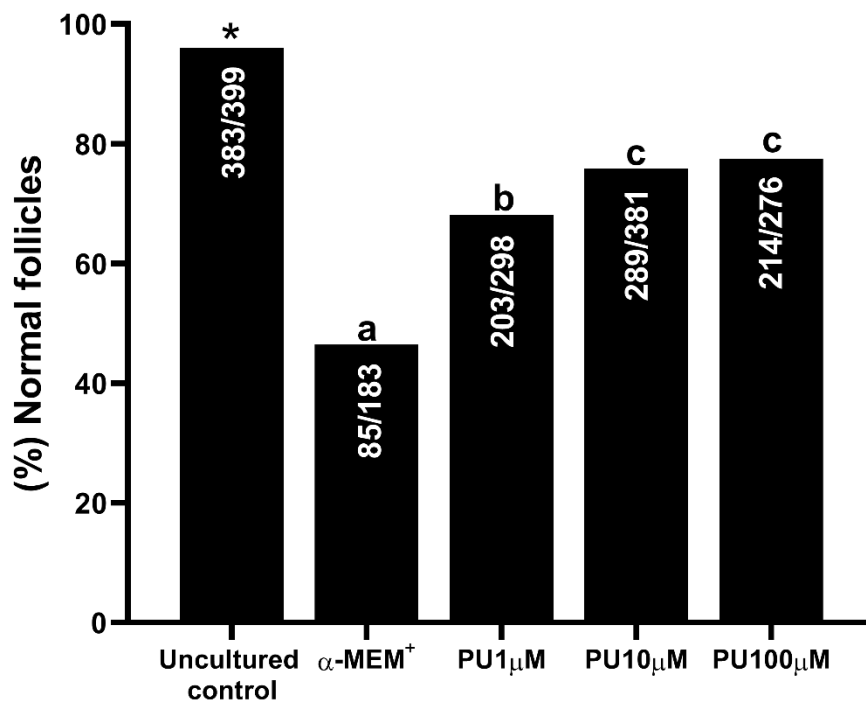


Figure 1. Percentages of morphologically normal follicles before and after culture of ovarian tissues in control medium alone or supplemented with 1, 10 and 100 μM punicalagin. a-b show significant difference, for six days ($P \leq 0,05$).

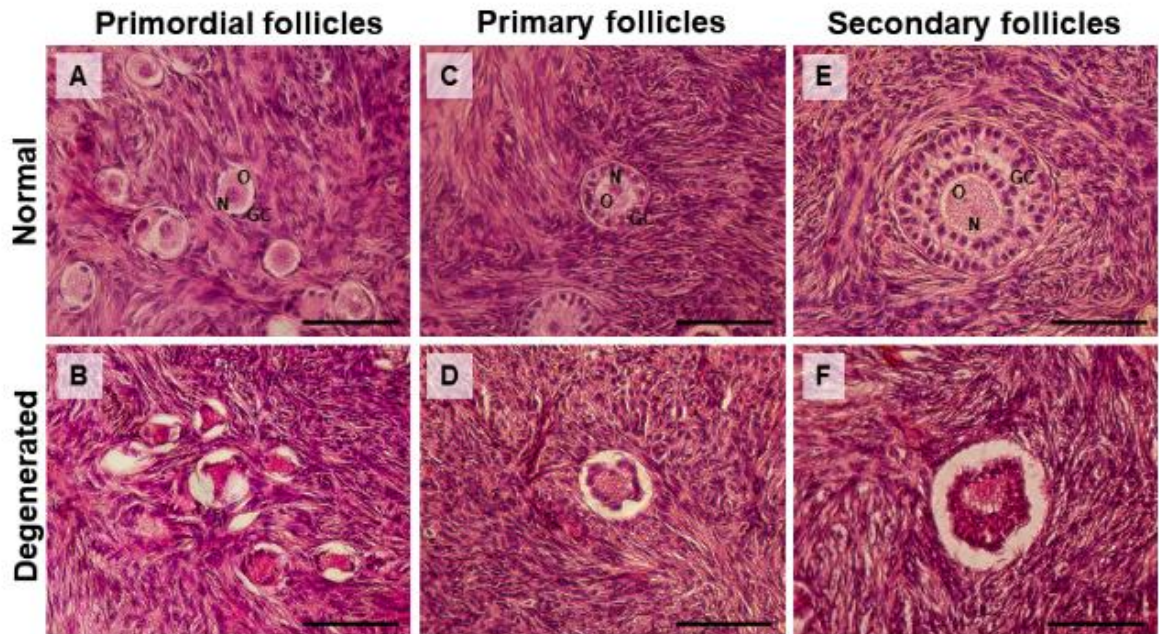


Figure 2. Representative images of sections of bovine ovarian tissue showing morphologically normal (a-c) and degenerate (d-f) follicles from different categories stained with hematoxylin and eosin. Normal primordial follicles (a) and degenerate (d); normal (b) and degenerate (e) primary; normal (c) and secondary degenerate (f). Granulosa cells (GC); oocyte (O); oocyte nucleus (N). Scale bar: 100 μm .

3.2. Effects of Punicalagin on activation and development of primordial follicles

Ovarian tissues cultured in all treatments showed a significant reduction in the percentage of primordial follicles and an increase in growing follicles when compared to the uncultured control (Figure 3). Additionally, the presence of Punicalagin (1, 10 or 100 μM) increased the percentage of developing follicles when compared to tissues cultured in control medium ($P \leq 0,05$).

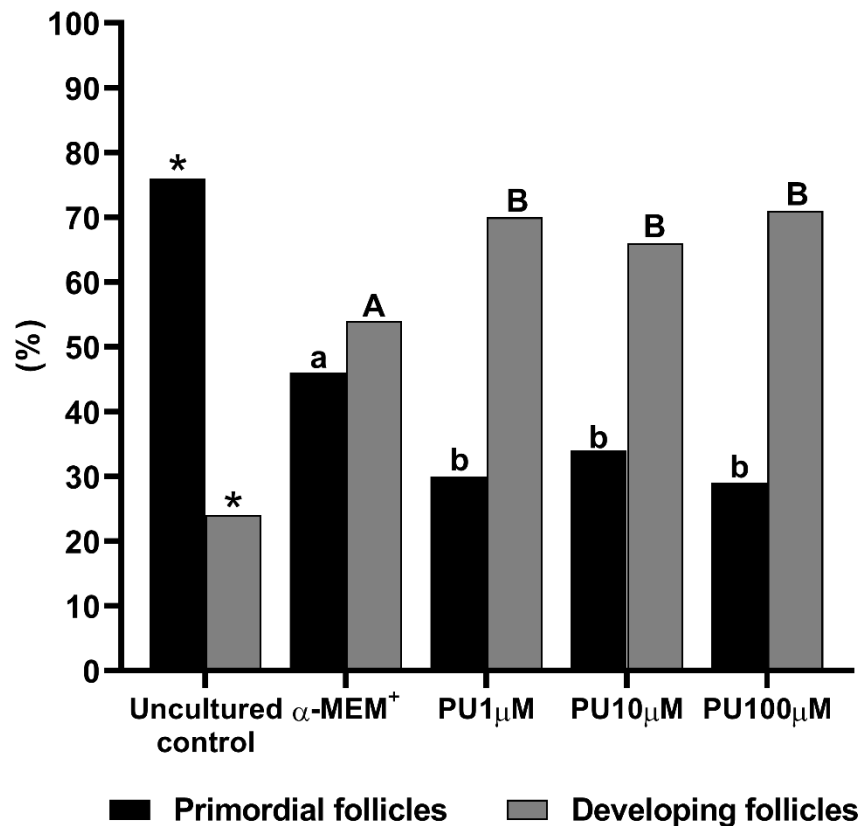


Figure 3. Percentages of primordial follicles (A) and developing follicles (B) in uncultured tissues and in tissues cultured for 6 days in control medium alone or supplemented with 1, 10 or 100 μ M Punicalagin (PU). a-b (lower case) represents significant differences in the percentages of primordial follicles. A-B (upper case) represents significant differences in the percentages of developing follicles ($P \leq 0,05$).

3.3. Effects of Punicalagin on stromal cell density after *in vitro* culture

Ovarian tissues cultured with and 1 and 10 μ M Punicalagin showed a reduction in the number of stromal cells when compared to the uncultured control. However, the presence of 100 μ M Punicalagin in the culture medium kept stromal cell density similar to uncultured tissues ($p \leq 0,05$) (Figure 4).

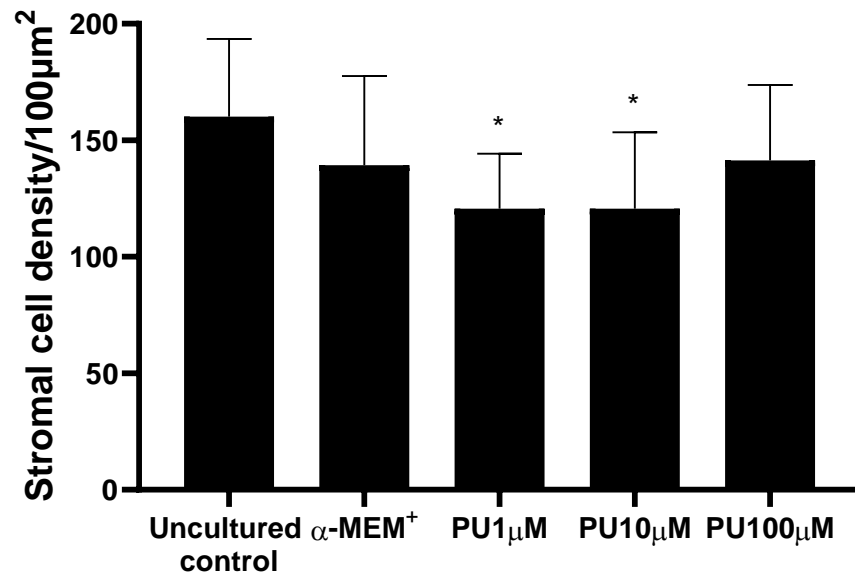


Figure 4. Stromal cell density in uncultured tissues and in tissues cultured for 6 days in control medium alone or supplemented with 1, 10 and 100 μM in Punicalagin (PU). * significant difference between uncultured and cultured tissues ($P \leq 0,05$).

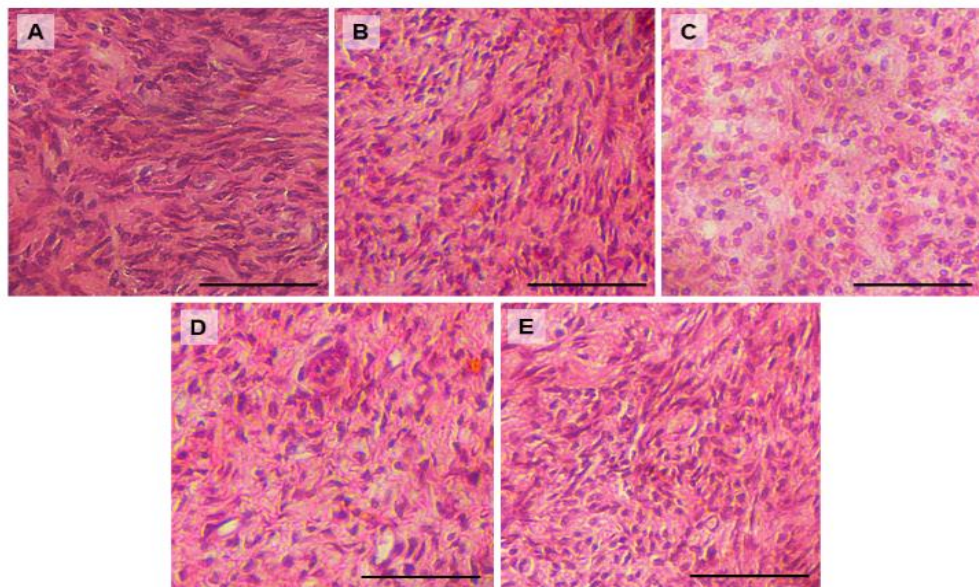


Figure 5. Representative images of stromal cells marked by hematoxylin and eosin staining and evaluated 10 fields per image. Fresh control (a); MEM (b); 1 μM (c); 10 μM (d); 100 μM Punicalagin (e). Scale bar: 100 μm .

3.4. Assessment of collagen fibers in ovarian extracellular matrix

Ovarian tissues cultured in control medium alone or supplemented with 1 or 100 μM of Punicalagin showed significantly reduced percentages of collagen fiber when compared to uncultured control (Figure 6). The percentage of collagen in tissue cultured in the presence of 10 μM Punicalagin, however, did not differ from non-cultured tissues.

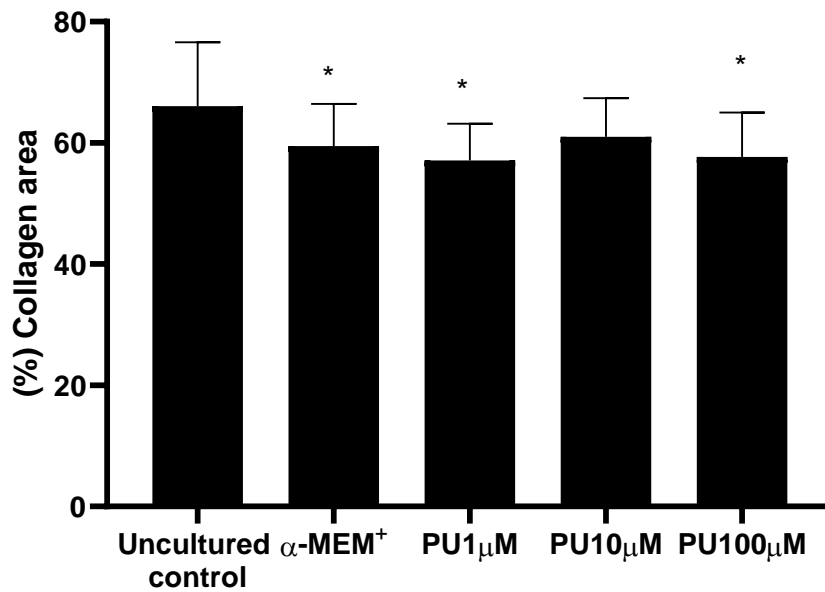


Figure 6. Collagen percentages in uncultured tissues and in tissues cultured for 6 days in control medium alone or supplemented with 1, 10 or 100 μM Punicalagin (PU). * indicates treatments that differed significantly from uncultured control ($p \leq 0,05$).

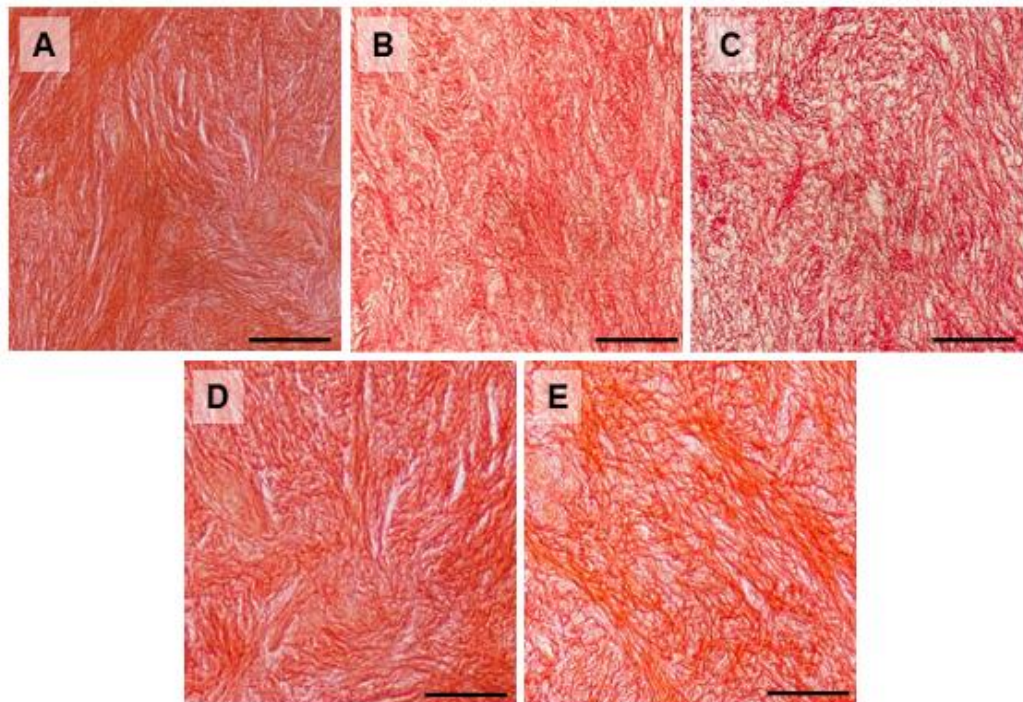


Figure 7. Representative images of collagen fibers labeled by a red picosirius stain and observed under optical microscopy (400x). Fresh control (a); MEM (b); 1 μ M (c); 10 μ M (d); 100 μ M Punicalagin (e). The black arrow shows an uncolored follicular area. Scale bar: 100 μ m.

3.5. Levels of mRNA for SOD, CAT, PRDX6, GPX1 and NRF2 after *in vitro* culture

The presence of 1 or 100 μ M Punicalagin in the culture medium significantly reduced the mRNA levels for SOD and CAT when compared to tissues cultured in control medium ($P \leq 0,05$). On the other hand, bovine ovarian tissues cultured in the presence of 10 μ M of Punicalagin had higher levels of mRNA for NRF2, GPX and PRDX than those seen in tissues culture with 1 or 100 μ M Punicalagin, but did not differ from tissues cultured in control medium (Figure 8).

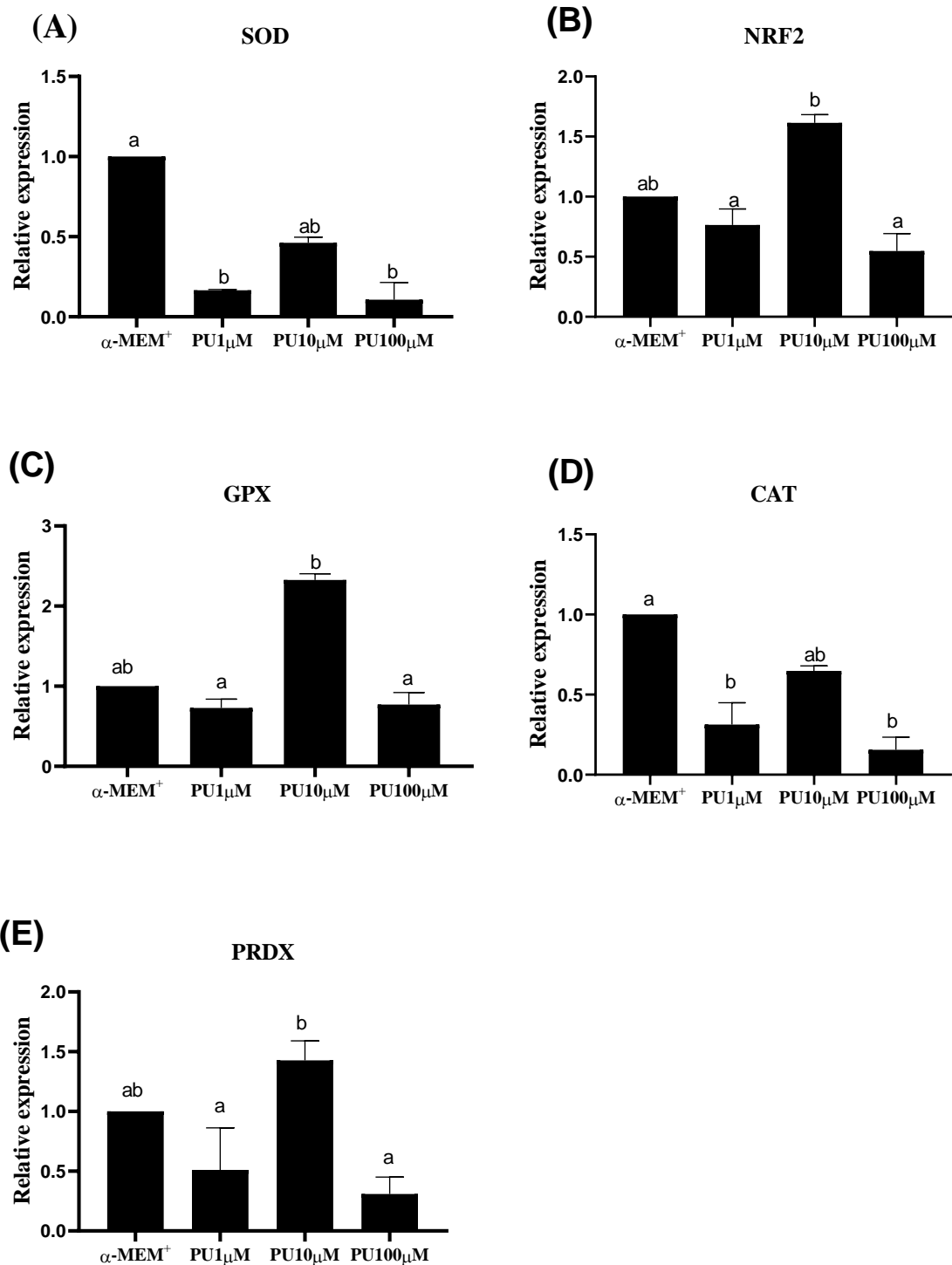


Figure 8. Levels of mRNA for SOD (A), NRF2 (B), GPX (C), CAT (D) and PRDX (E) in ovarian tissues after *in vitro* culture for 6 days in α -MEM⁺ alone or supplemented with 1.0 μ M, 10 μ M or 100 μ M Punicalagin (PU). a, b: indicate significant difference between treatments ($p \leq 0,05$).

3.6 Protein levels for SOD, CAT, TIOL and GPX after *in vitro* culture

The results showed that the ovarian tissues cultured with 10 μM of had significantly higher levels of thiol, as well as increased activity of SOD, CAT and GPX enzymes than those seen in tissues cultured in control medium (Figure 9). On the other hand, the presence of 1 or 100 μM did not influence the levels of thiol and activity of SOD, CAT, and GPX. Moreover, the activity of CAT was similar in tissues culture with 1, 10 or 100 μM .

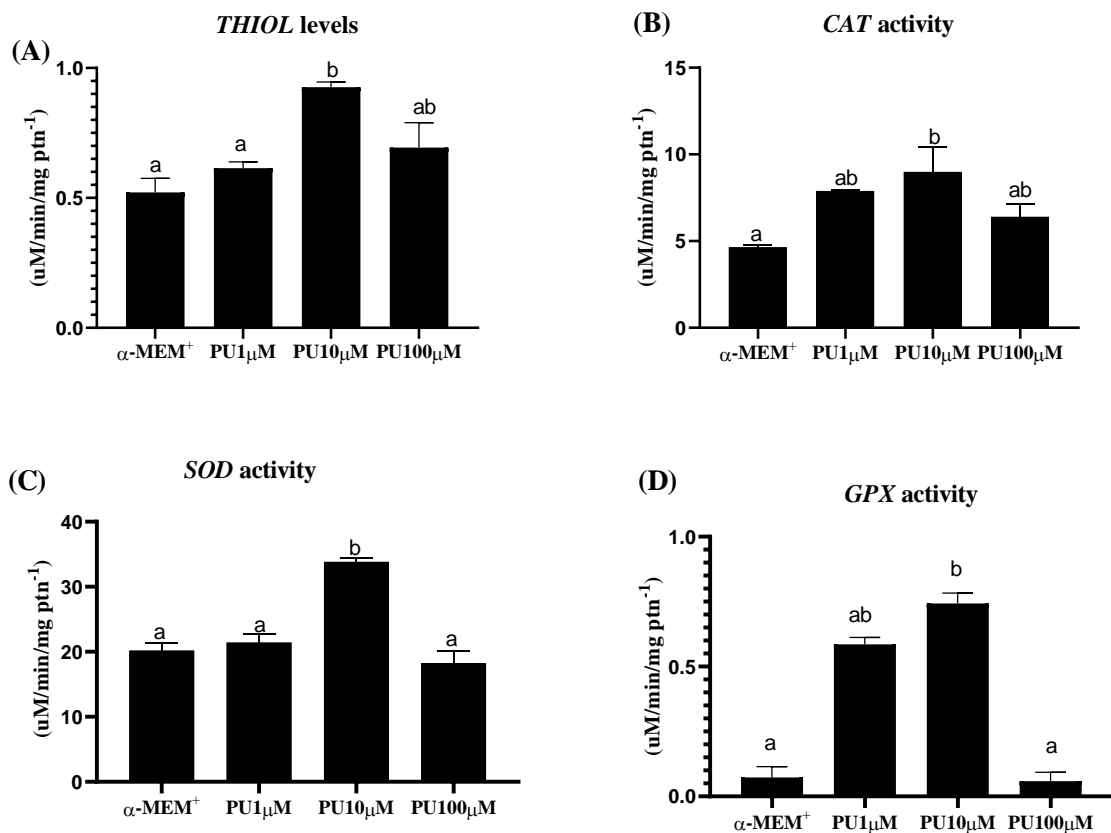


Figure 9. Levels of thiol (A) and activity of CAT (B), SOD (C), and GPX (D) in tissues cultured in $\alpha\text{-MEM}^+$ alone or supplemented with 1.0 μM 10 μM or 100 μM Punicalagin (PU). a, b different lower case letters indicate significant difference between treatments ($p \leq 0,05$).

4. Discussion

This study shows for the first time that Punicalagin improves primordial follicle survival and growth in cultured bovine ovarian cortical tissues. Previous studies have shown tha Punicalagin reduces apoptosis and p53 activity in cultured human trophoblasts under hypoxia (CHEN *et al.*, 2013). Punicalagin reduces BAX and

increases BCL-2 in cultured ARPE-19 exposed to UV-A radiation (CLEMENTI *et al.*, 2020). In HepG2 cells induced to oxidative stress, Punicalagin prevented the collapse of mitochondrial membrane potential, maintained adequate levels of ATP production, reduced levels of cleaved caspase 3 and prevented the release of cytochrome c and mitochondrial Bax translocation. The results show an increase in follicular survival associated with a higher rate of follicular growth. Punicalagin effectively increases cell viability in several cell types, such as HepG2 cells pretreated with Punicalagin exposed to palmitate (YAN *et al.*, 2016); RPE cells exposed to hydrogen peroxide (CLEMENTI *et al.*, 2021) and H9C2 cells exposed to doxorubicin (YE *et al.*, 2019).

This study shows that 10 μ M Punicalagin helped to preserve extracellular matrix collagen fibers in cultured ovarian tissues. Follicular development is highly regulated by the extracellular matrix, which provides mechanical structure and recognition motif for the initiation of signaling cascades (MACDONALD *et al.*, 2018; ZU *et al.*, 2023). Components of the extracellular matrix link together to form a structurally stable composite, providing tissues with physical support and biomechanical properties that are required for cellular differentiation and homeostasis (GROSBOIS *et al.*, 2023; THEOCHARIS *et al.*, 2016). By adhering to the cell surface integrin receptors, the extracellular matrix regulates cell survival, proliferation, differentiation, and steroid formation and promotes follicular development and maturation (ZHAO *et al.*, 2023). The extracellular matrix is also a reservoir of growth factors and bioactive molecules, such as hormones and growth factors, regulating spatially and temporally their diffusion and availability within the ovarian niche (BONNANS *et al.*, 2014; GROSBOIS *et al.*, 2023). Collagen is a critical molecule of the ovarian stromal extracellular matrix that undergoes extensive remodeling during *in vitro* culture of ovarian tissue (LI *et al.*, 2022) and increased oxidative stress during *in vitro* culture can strongly disrupt the extracellular matrix microarchitecture (MARTINS *et al.*, 2021; COSTA *et al.*, 2022). In our study, interestingly, 10 μ M Punicalagin positively influenced the levels of CAT, SOD, and GPX, in addition to increasing the levels of thiol. Thus, our results suggest that the preservation of collagen fibers in the extracellular matrix may have been provided by the reduction of oxidative stress during *in vitro* culture. Indeed, it has been reported that ROS accumulation upregulates the activity of matrix metalloproteinases (MMPs) such as MMP-1 and MMP-3 that degrade collagen

crosslinks and weaken the structural integrity of the collagen-rich ECM (MA *et al.*, 2023; LYU *et al.*, 2022; ALGE-PRIGLINGER *et al.*, 2009). Several studies have shown a positive relationship between increased antioxidant enzymes and the maintenance of collagen fiber integrity (ZAW *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2021; PETERSEN *et al.*, 2004). Li *et al.* (2022) demonstrated that Punicalagin protected skin collagen (type I) through dose-dependent collagenase inhibition. This authors also observed that 12.5 μM Punicalagin inhibited MMP-13 expression in A431 cell lines and, concomitantly, increased the expression of type I collagen.

Stromal cell density is an important indicator of tissue integrity and is likely to play a role in folliculogenesis through cellular mechano-sensing. Ovarian stromal cells have significant roles in folliculogenesis, particularly in the activation of primordial follicles and the differentiation of theca cells (MAGOFFIN *et al.*, 2005; TAN *et al.*, 2017; SHENG *et al.*, 2022). In our study, 1 and 10 μM Punicalagin reduced stromal cells density. Grosbois *et al.* (2023) reported significant increases of follicular activation, even with a quantitative reduction of stromal cells during culture. Although more studies are needed to elucidate how the stromal environment influences follicular dynamics *in vitro*, it seems to be clear that *in vitro* follicular activation occurs concurrently with a loosening of the ovarian cortex during culture, characterized by an early decrease in stromal cell density.

Interestingly, 10 μM Punicalagin increased thiol levels and the activity of SOD, CAT and GPX enzymes in cultured tissues. These antioxidant enzymes are responsible for controlling the formation of free radicals that culminate in the occurrence of oxidative damage to cellular components (LUSHCHAK, *et al.*, 2021; Chaudhary *et al.*, 2023). Concomitantly, Feng (2020) shows that Punicalagin effectively improves the antioxidant status of SOD, CAT and GPX proteins in connective tissue of mice induced to ankylosing spondylitis. Punicalagin also reverted testicular damage by increasing SOD, CAT and GSH enzymes in mice treated with lipopolysaccharides (RAO, 2016). Al-khawald (2022) shows that pretreatment with Punicalagin elevated GSH, SOD and CAT levels in mice injected with methotrexate.

The relationship of 10 μM Punicalagin and antioxidant defense in bovine ovarian tissue fragments was notable, by increasing the RNAm expression of NRF2, GPX and PRDX. Zhang *et al.* (2022) reported that Punicalagin increases the activities of

antioxidant enzymes regulated by Nrf2/ARE, such as GPx, which prevent the accumulation of hydrogen peroxide. Reszka *et al.* (2015) demonstrated that NRF2 mRNA level was positively correlated with the expression of NRF2 target genes, such as PRDX1. The increase in PRDX1 expression may be associated with its role as an oxidative stress sensor, as described by Bernardo *et al.* (2022). However, there was a reduction RNA expression for SOD and CAT in tissues cultured with 1 or 100 μM Punicalagin. We propose that Punicalagin-mediated increase in antioxidant status in bovine ovarian tissue occurs through increased mRNA levels for NRF2, GPX and PRDX. Previous studies have shown that pretreatment with Punicalagin significantly reversed the reduction in SOD1 mRNA caused by LPS and RAW264.7 cells (XU *et al.*, 2015). Nguyen-Ngoa *et al.* (2020) demonstrated that Punicalagin (20 μM) significantly blunted SOD2 mRNA expression in human placenta, visceral adipose and subcutaneous adipose. In this context, varying dosages or incubation times may also induce different changes on antioxidant activity. The imperfect mRNA–protein correlations arise from translation rate constants and protein half-lives differing between genes or between conditions. In this way, protein levels cannot be predicted from mRNA levels via constant gene-specific protein-to-mRNA ratios (BAUM *et al.*, 2019).

5. Conclusion

Punicalagin 10 μM promotes follicular viability and growth, maintains the integrity of the extracellular matrix and activates antioxidant defense at the mRNA and enzyme level in bovine ovarian tissue cultured *in vitro*. Punicalagin has unique properties that could revolutionize the *in vitro* culture environment, opening up exciting prospects for future scientific exploration.

Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interests.

Author contribution statement

Francisco F. C. Filho prepared the media and performed the *in vitro* culture. Francisco C. Costa prepared the histological sections of the cultured tissues and analyzed the

growth, percentages of follicles and their morphology and cell density. Miguel F. L. Neto analyzed the enzymatic activity of the samples. José J. N. Costa analyzed quantified mRNA levels by real-time PCR. Vitória S. Bezerra performed the statistical analysis, computational interpretation of data and wrote the original manuscript José R. V. Silva and Valdevane R. Araújo. designed the experiment and critically revised the manuscript. All the authors read, reviewed and approved the final version of the manuscript.

Declaration of Funding

The authors thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil), Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel (CAPES) and FUNCAP (Cearense Foundation for the Support of Scientific and Technological Development). V.S.Bezerra is a CAPES scholarship recipient, Brazil.

6. References

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods Enzymol.** v.105, p.121–126, 1984.

AGUIAR, F.L.N. *et al.* FSH supplementation to culture medium is beneficial for activation and survival of preantral follicles enclosed in equine ovarian tissue. **Theriogenology.** v. 85, p. 1106-1112, 2016.

ALGE-PRIGLINGER C.S. *et al.* Oxidative stress-mediated induction of MMP-1 and MMP-3 in human RPE cells. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v.50, n.11, p.5495-503, 2019.

AL-KHAWALDE A. *et al.* Punicalagin Protects against the Development of Methotrexate-Induced Hepatotoxicity in Mice via Activating Nrf2 Signaling and Decreasing Oxidative Stress, Inflammation, and Cell Death. **Int J Mol Sci.** v. 15, n. 20, p.12334, 2022.

BANNISTER, J. V.; CALABRESE, L. Assays for superoxide dismutase. **Methods of Biochemical Analysis**, v. 32, p. 279-312, 1987.

BAUM, K. *et al.* Of gene expression and cell division time: a mathematical framework for advanced differential gene expression and data analysis. **Cell Syst.** v. 9, p.569–579, 2019.

BENCHAGRA, L. *et al.* Antioxidant Effect of Moroccan Pomegranate (*Punica Granatum* L. Sefri Variety) Extracts Rich in Punicalagin against the Oxidative Stress Process. **Foods**, v. 10, n. 9, p. 2219, 2021.

BERNARDO, V.S. *et al.* Potential Cytoprotective and Regulatory Effects of Ergothioneine on Gene Expression of Proteins Involved in Erythroid Adaptation Mechanisms and Redox Pathways in K562 Cells. **Genes**. v. 13, p.2368, 2022.

BONNANS C. *et al.* Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v.15, n.12, p. 786-801, 2014.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BUCCITELLI, C. *et al.* mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. **Nature Reviews Genetics**. v.21, n.10 p. 630-644, 2020.

CAVALCANTE GC, *et al.* A Cell's Fate: An Overview of the Molecular Biology and Genetics of Apoptosis. **Int J Mol Sci**. v.20, n.17, p.4133. 2019.

CHEN, B. *et al.* Punicalagin, a polyphenol in pomegranate juice, downregulates p53 and attenuates hypoxia-induced apoptosis in cultured human placental syncytiotrophoblasts. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v.305, n.10, 2013.

CHEN, X. *et al.* Effects of dietary astaxanthin on the growth, innate immunity and antioxidant defence system of *Paramisgurnus dabryanus*. **Aquaculture Nutrition**. v. 26, 2020.

CLEMENTI M. *et al.* Punicalagin Protects Human Retinal Pigment Epithelium Cells from Ultraviolet Radiation-Induced Oxidative Damage by Activating Nrf2/HO-1

Signaling Pathway and Reducing Apoptosis. **Antioxidants** (Basel). v. 2, n.6, p.473, 2020.

CLEMENTI, M. E. *et al.* Cytoprotective Effects of Punicalagin on Hydrogen–Peroxide–Mediated Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Retinal Pigment Epithelium Cells. **Antioxidants**, Itália, v. 10, n. 2, p. 192, Jan./2021.

Costa F.D.C *et al.* Aloe vera increases mRNA expression of antioxidant enzymes in cryopreserved bovine ovarian tissue and promotes follicular growth and survival after *in vitro* culture. **Cryobiology**. v.102, p.104-113, 2021.

ELLMAN, G. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n. 1, p. 70-77, 1959.

FIGUEIREDO, J.R. *et al.* Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré antrais – MOIFOPA. In: GONÇALVES, P.B.D., **Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal**. Editora Roca, São Paulo, p.303-327, 2008.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.** V.105, p.114–120, 1984.

GROSBOIS J, *et al.* Spatio-temporal remodelling of the composition and architecture of the human ovarian cortical extracellular matrix during *in vitro* culture. **Hum Reprod.** v.38, n.3, p.444-458, 2023.

HE, C.; *et al.* Mitochondria synthesize melatonin to ameliorate its function and improve mice oocyte quality under *in vitro* conditions. **Int J Mol Sci.** v.17, n.6, 2016.

HORI, Y.S. *et al.*, Regulation of FOXOs and p53 by SIRT1 Modulators under Oxidative Stress. **PLOS ONE**, v. 8, n. 9, 2013.

KADERIDES, K. *et al.*, Potential of pomegranate peel extract as a natural additive in foods. **Trends in Food Science & Technology**. v.115, p.380-390, 2021.

KULKARNI, A, P. *et al.* *In vitro* studies on the binding, antioxidant, and cytotoxic actions of punicalagin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 1491- 1500, 2007.

LEE MJ, *et al.* Extracellular Superoxide Dismutase Prevents Skin Aging by Promoting Collagen Production through the Activation of AMPK and Nrf2/HO-1 Cascades. **J Invest Dermatol**. v.141, n.10, p.2344-2353, 2021.

LI H, *et al.* Standardized Pomegranate (Pomella®) and Red Maple (Maplifa®) Extracts and Their Phenolics Protect Type I Collagen by the Inhibition of Matrix Metalloproteinases, Collagenase, and Collagen Cross-Linking. **Molecules**. v.27, n.22, p.7919, 2022.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Análise de dados relativos à expressão gênica usando PCR quantitativo em tempo real e o método $2^{-\Delta\Delta C(T)}$. **Méthods**, v. 25, n. 4, p.402-8, 2001.

LUSHCHAK V.I. *et al.* Oxidative stress concept updated: Definitions, classifications, and regulatory pathways implicated. **EXCLI J**. v.20, p. 956-967, 2021.

MA Z, *et al.* Anemonin reduces hydrogen peroxide-induced oxidative stress, inflammation and extracellular matrix degradation in nucleus pulposus cells by regulating NOX4/NF- κ B signaling pathway. **J Orthop Surg Res**. v.18, n.1, p.189, 2023.

MACDONALD, J.A. *et al.* Extracellular matrix signaling activates differentiation of adult ovary-derived oogonial stem cells in a species-specific manner. **Fertility and sterility**. v. 111, n.4, p. 794-805,2019.

MAGOFFIN D.A. Ovarian theca cell. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 37, p.1344–1349, 2005.

MARTINS *et al.* Regulatory factors of folliculogenesis in mammalian. Revista Brasileira de **Reprodução Animal**. v.32, n.1, p.36-49,2008.

NAVALE G.R. *et al.* Effect of cycloastragenol and punicalagin on Prp(106–126) and A β (25–35) oligomerization and fibrillization. **Biophysical Chemistry**. v. 302, 2023.

NGUYEN-NGO, C., *et al.* Anti-inflammatory effects of phenolic acids punicalagin and curcumin in human placenta and adipose tissue. *Placenta*, v.100, p.1–12. 2020.

PACKOVA, D. *et al.* effective compounds of pomegranate and their effect on animal cells. **J Microbiol Biotech Food Sci**, v.3, p.142-144, 2014.

PETERSEN S.V. *et al.* Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) binds to type I collagen and protects against oxidative fragmentation. **J Biol Chem**. v.279, n.14, p.13705-10, 2004.

PFAFFL M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**. v.29, n.9, 2001.

RAMLAGAN.P. *et al.* Advances towards the analysis, metabolism and health benefits of punicalagin, one of the largest ellagitannin from plants, with future perspectives. *Phytomedicine Plus*. V.3, n.2, p.2. 2022.

RAO, F. *et al.* Potential role of punicalagin against oxidative stress induced testicular damage. **Asian J Androl**. v.18, n.4, p.627-632. 2016.

RESZKA E. *et al.* Association between plasma selenium level and NRF2 target genes expression in humans. **J Trace Elem Med Biol**. v.30, p.102-106, 2015.

RITTIÉ L. *et al.* Method for Picrosirius Red-Polarization Detection of Collagen Fibers in Tissue Sections. **Methods Mol Biol**. v.1627, p.395-407, 2017.

SALGADO, J. M. *et al.* Increased antioxidant content in juice enriched with dried extract of pomegranate (*Punica Granatum*) peel. **Plant Foods for Human Nutrition**. v. 67, n. 1, p. 39-43, 2012.

SHENG, X. *et al.* Temporal and spatial dynamics mapping reveals follicle development regulated by different stromal cell populations. 2022

SILVA, B. *et al.* Different Mechanisms to Control Oxidative Stress and Primordial Follicle Activation and Survival During *in vitro* Culture of Bovine Ovarian Tissue. **Social Science Research Network**. 2023.

SIMON LE, K.T.R.; DUNCAN, F.E. *In vitro* ovarian follicle growth: a comprehensive analysis of key protocol variables†. **Biol Reprod**. v.103, n.3, p.455-470, 2020.

SREEDHAR A, *et al.* Mitochondria in skin health, aging, and disease. *Cell Death Dis*. v.11, n.6, 2020.

TAKAHASHI, H., NARA, Y.; TUZIMURA, K. Fluorometric Determination of Glutathione by N- 9-Acridinyl -maleimide and Its Application to Biological Materials. **Agricultural and Biological Chemistry** v.42, n. 4, p.769-774, 1978.

TAN S. *et al.* Stromal Senp1 promotes mouse early folliculogenesis by regulating BMP4 expression. **Cell & Bioscience**. v.7, n.36, 2017.

TELFER, E.E. *et al.* A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. **Hum Reprod**. V.23, p. 1151-1158, 2008.

THEOCHARIS A.D. Extracellular matrix structure. **Adv Drug Deliv Rev**. v.97, 2016.

YAN C. *et al.* Punicalagin attenuates palmitate-induced lipotoxicity in HepG2 cells by activating the Keap1-Nrf2 antioxidant defense system. **Mol Nutr Food Res**. v.60 n.5, p. 1139-49, 2016.

YANG L. *et al.* The Role of Oxidative Stress and Natural Antioxidants in Ovarian Aging. **Frontiers in Pharmacology**. v.11, p. 1663-9812, 2021.

ZAW K. *et al.* Catalase restores the altered mRNA expression of collagen and matrix metalloproteinases by dermal fibroblasts exposed to reactive oxygen species. **Eur J Dermatol**. v.16, n.4, p.375-9, 2006.

ZHANG Y, *et al.* Punicalagin Protects against Diabetic Liver Injury by Upregulating Mitophagy and Antioxidant Enzyme Activities. **Nutrients**. v. 6, n.14, 2022.

Zhao X. *et al.* A Novel Three-Dimensional Follicle Culture System Decreases Oxidative Stress and Promotes the Prolonged Culture of Human Granulosa Cells. **ACS Appl Mater Interfaces**. v.15, n.12, p.15084-15095, 2023.

ZHU, M. *et al.* "The role of Hippo pathway in ovarian development. **Frontiers in physiology**. v. 14, 2023.

7. CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os achados, concluímos que:

- ✓ A Punicalagina aumenta a ativação e sobrevivência folicular em tecido ovariano bovino cultivado por de 6 dias.
- ✓ A Punicalagina, na concentração de 100 μM apresentou semelhança ao grupo controle nas fibras de colágenas, e redução nas concentrações de 1 e 10 μM em tecido ovariano cultivado *in vitro*.
- ✓ A Punicalagina, na concentração de 10 μM , aumenta a expressão de mRNA para NRF2, GPX e PRDX, bem como os níveis de TIOL e enzimas SOD, CAT e GPX.

8. PERSPECTIVAS

A utilização da Punicalagina como suplemento para o meio de cultivo de tecido ovariano representa uma importante ferramenta para o combate ao estresse oxidativo *in vitro*, além de incentivar a prospecção e novos estudos com substâncias antioxidantes a fim de elucidar mecanismos da foliculogênese na espécie bovina. Entretanto, futuros estudos visando investigar os mecanismos de ação da Punicalagina em diferentes categorias foliculares serão de grande relevância para elucidação mais precisa do potencial antioxidante desta substância. Ademais, o impacto da adição de Punicalagina no cultivo folicular *in vitro* pode representar uma estratégia para melhorar a eficiência da maturação oocitária *in vitro* em diferentes espécies.

REFERÊNCIAS

- ABDULHADI HL. *et al.* Punicalagin protects against the development of pancreatic injury and insulinitis in rats with induced T1DM by reducing inflammation and oxidative stress. **Mol Cell Biochem**. V.477, n.12, p. 2817-2828, 2022.
- ABEDELAAHI, A. *et al.* Sodium selenite improves the *in vitro* follicular development by reducing the reactive oxygen species level and increasing the total antioxidant capacity and glutathione peroxidase activity, **Human Reproduction**, v.25, p.977–985, 2010.
- ADONA P.R. *et al.* Review Article: Oogenesis and folliculogenesis in mammals. UNOPAR científica. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v.15, n.3, p.245-50, 2013.
- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SIKKA, S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. **Curr Opin Obstet Gynecol**, v. 18, n.3, p. 325-32, 2006.
- AGUIAR, F.L.N. *et al.* FSH supplementation to culture medium is beneficial for activation and survival of preantral follicles enclosed in equine ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 85, p. 1106-1112, 2016.
- ALI, S. S. *et al.* Understanding oxidants and antioxidants: classic team with new players. **Journal of Food Biochemistry**, p.131-145, 2020.
- AL-KHAWALDE A. *et al.* Punicalagin Protects against the Development of Methotrexate-Induced Hepatotoxicity in Mice via Activating Nrf2 Signaling and Decreasing Oxidative Stress, Inflammation, and Cell Death. **Int J Mol Sci**. v. 15, n. 20, p.12334, 2022.
- AL-MAMARY M. *et al.* The Presence and Impact of Hydroxyl Groups in Small Molecules of Natural and Synthetic Origin. **Antioxidants** – 2021.
- AQUINO, V. V. F. *et al.* Metabólitos Secundários e ação antioxidante de *Croton hellebriifolius* e *Croton blanchetianus*. **Acta Brasiliensis**, v. 1, n. 3, p.7-10, 2017.
- ARAÚJO VR, *et al.* Long-term *in vitro* culture of bovine preantral follicles: Effect of base medium and medium replacement methods. **Anim Reprod Sci**. v.161, p.23–31, 2015.
- ARAÚJO, R.A. *et al.* *In vitro* culture of bovine preantral follicles: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12, n.78, p.12-78, 2014.
- AZEVEDO V. *et al.* Effects of Aloe vera extract on growth, viability, ultrastructure and expression of mRNA for antioxidant enzymes in bovine secondary follicles cultured *in vitro*. **Animal Reproduction Science**. v. 247. 2022.
- BAHR, J.M. Ovary, overview. **Reference Module in Biomedical Sciences**, v. 2, p. 3-7, 2018.

BARBERINO, R. *et al.* Amburana cearensis leaf extract maintains survival and promotes the *in vitro* development of secondary sheep follicles. **Zygote**, v.24, n. 2, p. 277-285, 2016.

BARBERINO, R. S. **Efeitos dos antioxidantes melatonina e epigalocatequina-3-galato sobre o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais ovinos e contra os danos ovarianos induzidos pela ciclofosfamida em camundongos.** 2021. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2021.

BARBERINO, R.S. *et al.* Amburana cearensis leaf extract maintains survival and promotes *in vitro* development of ovine secondary follicles. **Zygote**, V.24, n.2, p. 277-285, 2015.

BELLEZZA, I. *et al.* Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. **BBA – Molecular Cell Research**. n. 1865, p. 721 – 733, 2018.

BENCHAGRA, L. *et al.* Antioxidant Effect of Moroccan Pomegranate (*Punica Granatum* L. Sefri Variety) Extracts Rich in Punicalagin against the Oxidative Stress Process. **Foods**, v. 10, n. 9, p. 2219, 2021.

BIZARRO-SILVA, C. *et al.* Interval in the replacement of *in vitro* culture medium affects the integrity and development of equine preantral follicles. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, 2018.

BORGES, A.M.R. **Produtos naturais à base de plantas na prevenção e melhoria do fotoenvelhecimento cutâneo.** 2017. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) - Universidade de Algarve - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Faro.2017.

BRITT J.H. Impacts of early postpartum metabolism on follicular development and fertility. **Bov. Pract. Proc.** v. 24, p.39-43, 1991.

CALEJA, C. *et al.* Foeniculum Mill. Utilizado como antioxidante em iogurtes: comparação entre o ingrediente natural e um aditivo sintético. **VIII Encontro de Química dos Alimentos**, p. 262-268, 2016.

CAROU, M. C. *et al.* Apoptosis in ovarian granulosa cells of cattle: Morphological features and clearance by homologous phagocytosis. **Acta Histochemica**, v. 117, n. 1, p. 92–103, 2015.

CAVALCANTE, A. Y. P. *et al.* Effect of ovarian tissue storage in Morus nigra extract on the morphology and DNA fragmentation of ovine preantral follicles. **Ciências Agrárias**, v.38, p.1973, 2017.

CAVALCANTE, B. N. *et al.* Effects of melatonin on the morphology and development of primordial follicles during *in vitro* culture of bovine ovarian tissue. **Reproduction in Domestic Animals**, v.54, p.1567-1573, 2019.

CECCONI S. *et al.* Granulosa cell-oocyte interactions. **European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology**. v.115, p. 19 -22, 2004.

CHAUBE, S.K. *et al.* Clomiphene citrate induces ROS-mediated apoptosis in mammalian oocytes. **Open J Apoptosis**, v.3, p.52–58, 2014.

CHEN, B. *et al.* Punicalagin, a polyphenol in pomegranate juice, downregulates p53 and attenuates hypoxia-induced apoptosis in cultured human placental syncytiotrophoblasts. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v.305, n.10, 2013.

CLEMENTI M. *et al.* Punicalagin Protects Human Retinal Pigment Epithelium Cells from Ultraviolet Radiation-Induced Oxidative Damage by Activating Nrf2/HO-1 Signaling Pathway and Reducing Apoptosis. **Antioxidants** (Basel). v. 2, n.6, p.473, 2020.

CLEMENTI, M. E. *et al.* Cytoprotective Effects of Punicalagin on Hydrogen–Peroxide–Mediated Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Retinal Pigment Epithelium Cells. **Antioxidants**, Itália, v. 10, n. 2, p. 192, Jan./2021.

COMBELLES, C.M. *et al.*, A. Could oxidative stress influence the in- vitro maturation of oocytes **Reproductive BioMedicine Online**, v. 18, n. 6, p. 864-880, 2009.

COMBELLES, C.M. *et al.*, A. Could oxidative stress influence the in- vitro maturation of oocytes **Reproductive BioMedicine Online**, v. 18, n. 6, p. 864-880, 2009.

CORTVRINDT, R.; SMITZ, J. *In vitro* follicle growth: Achievements in mammalian species. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, n. 1, p. 3-9, 2001.

CUI, Hang; KONG, Yahui; ZHANG, Hong. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. **Journal of signal transduction**, v. 2012, 2012.

CUNHA *et al.* Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. **Diversitas Journal**, v. 1, 175-181, 2016.

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

ELDH, MARIA. *et al.* Exosomes communicate protective messages during oxidative stress; possible role of exosomal shuttle RNA. **PloS one**. v.5, p. 12 -15, 2010.

EMBRAPA: QUALIDADE DA CARNE BOVINA. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/qualidade-da-carne/carne-bovina>>. Acesso em: 29. Jul. 2022.

EPPIG JJ. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization *in vitro*. **Biol Reprod**, v.41, p.268–276, 1989.✓

FENG X. *et al.* Punicalagin Exerts Protective Effects against Ankylosing Spondylitis by Regulating NF- κ B-TH17/JAK2/STAT3 Signaling and Oxidative Stress. **Biomed Res Int.** 2020.

FERREIRA, F.; FERREIRA, R.; DUARTE, J. A. Exercício agudo e stress oxidativo muscular esquelético. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto**, v.7, n.2, p.257–275, 2008.

FIGUEIREDO, J. R.; LIMA, L. F. Tecnologia do ovário artificial: aplicações, estado da arte, limitações e perspectivas. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.41, n.1, p.248-253, 2017.

FIGUEIREDO, J.R. Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability *in vitro*. **Zygote**. V.15, p.173–18, 2007.

FIGUEIREDO, J.R. *et al.* Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré antrais – MOIFOPA. In: GONÇALVES, P.B.D., **Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal**. Editora Roca, São Paulo, p.303-327, 2008.

FILIPOVIC, M. *et al.* QSAR of the free radical scavenging potency of selected hydroxybenzoic acids and simple phenolics. **Comptes Rendus Chimie**, v.18, p.492-498, 2015.

FISHER, A. B. *et al.* A new activity of lysophosphatidylcholine acyl transferase is expressed by peroxyoxine 6. **Journal of Lipid Research**, v.57, p.587–596, 2016.

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

FORTUNE, J.E. *et al.* Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biol. Reprod.**, v.65, n.3, p.648–654, 2001.

GASTAL, G.D.A. *et al.* Effect of cryopreservation techniques on proliferation and apoptosis of cultured equine ovarian tissue. **Theriogenology**, v.126, p. 88-94, 2019.

GATHWALA, G.; AGGARWAL, R. Selenium supplementation for the preterm Indian neonate. **Indian Journal of Public Health**, v.60, n.2, p.142–144, 2016.

GERSHON, E.; DEKEL, N.; Newly Identified Regulators of Ovarian Folliculogenesis and Ovulation. **International Journal of Molecular Sciences**, v.21, n. 12, 2020.

GHATEBI, M. *et al.* Implications from early life stress on the development of mouse ovarian follicles: Focus on oxidative stress. **The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v.45, p.1506-1514, 2019.

GILL, S.S.; TUTEJA, N.; Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiol Biochem**. v.48, p.909–930, 2010.

GLORIEUX, C.; CALDERON, P.; Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. **Biological Chemistry**, v. 398, n. 10, 2017.

GÓTH, L.; RASS, P.; PÁY, A. Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Molecular Diagnosis*. v.8, p.141–149, 2004.

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

GUPTA, S. *et al.* Estresse oxidativo e seu papel na infertilidade feminina e na reprodução assistida: implicações clínicas. *International Journal of Fertility and Sterility*, v.2, p.147– 164, 2014.

HAHN, G. F.; OLIVEIRA, R. J.; BOCK, P. M. The role of factor 2-related erythroid nuclear factor 2 (Nrf2) in diabetes mellitus. *Clinical & Biomedical Research*.v.37, n. 3, p.203-213, 2017.

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

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M.; Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean. *British Journal of Pharmacology*. v. 142, n. 2, p. 231-55, 2004.

HARDY, M. L. M. *et al.* Redox Regulation and Oxidative Stress in Mammalian Oocytes and Embryos Developed InVivo and *in vitro*. *International journal of environmental research and public health* v. 18, n.21, 2021.

HE, C.; *et al.* Mitochondria synthesize melatonin to ameliorate its function and improve mice oocyte quality under *in vitro* conditions. *Int J Mol Sci*. v.17, n.6, 2016.

HORI, Y.S. *et al.*, Regulation of FOXOs and p53 by SIRT1 Modulators under Oxidative Stress. *PLOS ONE*, v. 8, n. 9, 2013.

HU, X.M. *et al.* Guidelines for Regulated Cell Death Assays: A Systematic Summary, A Categorical Comparison, A Prospective. *Front Cell Dev Biol*. v. 4, n. 9, 2021.

HUSSEIN A. *et al.* Pomegranate juice and punicalagin-mediated chemoprevention of hepatocellular carcinogenesis via regulating miR-21 and NF-κB-p65 in a rat model. *Cancer Cell Int*. v.22, n.1, 2022.

IBRAHIM, M. A. A. *et al.* Effects of maternal malnutrition during lactation on the prostate of rats off spring at puberty: a histological, immunohistochemical and morphometric study. *Egyptian Journal of Hematology*, v.37, p.710-719, 2014.

IDELCHIK, M. P. S. *et al.* Mitochondrial ROS control of cancer. *Seminars in Cancer Biology*, p.0–1, 2016.

JIMENEZ CR. *et al.* The base medium affects ultrastructure and survival of bovine preantral follicles cultured *in vitro*. *Theriogenology*. v.85, p.1019–1029, 2016.

KHAN, A. *et al.* O silenciamento do gene catalase mediado por RNAi promove apoptose e impede a proliferação de células da granulosa bovina sob estresse térmico. **Animais Basel**; v.10, 2020.

KULKARNI, A, P. *et al.* *In vitro* studies on the binding, antioxidant, and cytotoxic actions of punicalagin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 1491- 1500, 2007.

KULKARNIA, A. P.; ARADHYAA, S. M.; DIVAKARB, S. Isolation and identification of a radical scavenging antioxidant – Punicalagin from pith and carpellary membrane of pomegranate fruit. **Food Chem.** v.87, p. 551–7. 2004.

LAPOINTE. *et al.* Estrogen Selectively Up-Regulates the Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase in the Oviducts, **Endocrinology**. v.146, p. 2583–2592, 2005.

LEE, H.N.; CHANG, E.M. Primordial follicle activation as new treatment for primary ovarian insufficiency. **Clinical and Experimental Reproductive Medicine**, v.46, n. 2, p. 43-49, 2019.

LEN, J.S. *et al.* The roles of reactive oxygen species and antioxidants in cryopreservation. **Bioscience Reports**, v.39, n.8, 2019.

LEYENS, G. *et al.* Peroxiredoxin 6 Is Upregulated in Bovine Oocytes and Cumulus Cells During *in vitro* Maturation: Role of Intercellular Communication. **Biology of Reproduction**. v.71, p.1646–1651, 2004.

LI, J.; FOOTE, R.H.; SIMKIN, M. Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase, taurine, or superoxide dismutase. **Biology of Reproduction**, v. 49, p.33–37, 1993.

LIMA, G. L.; SILVA, A. R. Adaptação da tecnologia do ovário artificial para os animais silvestres. n. **Conera**, v.42, n.3-4, p.146-154, 2018.

LINS, T.L.B.G. *et al.* Rutin can replace the use of three other antioxidants in the culture medium, maintaining the viability of sheep isolated secondary follicles. **Theriogenology**, v. 89, p. 263-270, 2017.

LU, J. *et al.* A novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction. **Reprod Biol Endocrinol**, v.16, n.1, p.80, 2018.

LUO J *et al.* Punicalagin Reversed the Hepatic Injury of Tetrachloromethane by Antioxidation and Enhancement of Autophagy. **J Med Food**. v. 22, n.12, p.1271, 2019.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. Chémico, **Biological Interactions**, v.224, p.164-175, 2014.

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

LUZ, V.B. *et al.* Kit ligand and insulin-like growth factor I affect the *in vitro* development of ovine preantral follicles. **Small Rumin Research**, v.115:99e102, 2013.

MA L, t al. Baicalin Alleviates Oxidative Stress and Inflammation in Diabetic Nephropathy via Nrf2 and MAPK Signaling Pathway. **Drug Des Devel Ther.** v. 21, n.15, p.3207-3221, 2021.

MAIA, M. S. **Viabilidade espermática e geração de metabólitos Reativos do Oxigênio (ROS) no semen ovino criopreservado em diluidor aditivado de Lauril Sulfato de Sódio (OEP), Trolox-C e Catalase.** 2006. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.

MAKKER, A. *et al.* PI3K/PTEN/Akt and TSC/mTOR signaling pathways, ovarian dysfunction, and infertility: an update. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.53, n.3, p. 103-118, 2023.

MANEVICH, Y.; FEINSTEIN, S. I.; FISHER, A. B. Activation of the antioxidant enzyme peroxiredoxin 1-CYS requires heterodimerization-mediated glutathylation with pi GST. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101, p.3780-3785, 2004.

MARGIS, R. *et al.* Glutathione peroxidase family - An evolutionary overview. **The FEBS Journal**, v.275, n.15, p.3959–3970, 2008.

MARINO, P.C. *et al.* Growth and Differentiation Factor-9 Supplementation Affects Viability and Morphology of Preantral Follicles in Equine Ovarian Fragments During Short-term *in vitro* Culture. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, 2019.

MARTINS *et al.* Regulatory factors of folliculogenesis in mammalian. Revista Brasileira de **Reprodução Animal**. v.32, n.1, p.36-49,2008.

MATZUK M.*et al.* Ovarian function in superoxide dismutase 1 and 2 knockout mice. **Endocrinology**. v.139, p.4008–4011,1998.

MBEMYA, G. T. *et al.* Supplementation of *in vitro* culture media with FSH to grow follicles and mature oocytes can be replaced by extracts of *Justicia insularis*. **PloS one**, v. 13, n. 12, 2018.

MELLO, R. R. C. *et al.* Desenvolvimento folicular inicial em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.37, n.4, p.328-333,2013.

MENDES.A *et al.* Tópicos Físicos, Químicos e Biológicos - Estresse oxidativo e sistemas antioxidantes: conceitos fundamentais sob os aspectos da nutrição e da ciência dos alimentos. **Tecnologia de alimentos**. v.2, n. 1, 2020.

MENEGON, S. *et al.* The dual roles of Nrf2 in cancer. **Trends in Molecular Medicine**. v.22, p. 578–593, 2016.

MIMURA, J.; ITOH, K. Role of Nrf2 in the pathogenesis of atherosclerosis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 88, p. 221-32, 2015.

MOLINARO, E.M. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: / Organização de Etelcia Moraes Molinaro, Luzia Fátima Gonçalves Caouto e Maria Regina Reis Amendoeira. – Rio de Janeiro: v. 2, 2010.

MORAIS, M. L. *et al.* Natural antioxidants in the vitrification solution improve the ovine ovarian tissue preservation. **Reproductive Biology**, Brasil, v. 19, n. 3, p. 270-278, jul./2019.

NETO, C. *et al.* The effect of bioidentical nanostructured progesterone in the *in vitro* culture of preantral follicles and oocyte maturation. **Cell Tissue**. v. 382, p. 657–664 2020.

NITURE, S. K.; KHATRI, R.; JAISWAL, A. K. Regulation of Nrf2-an update. **Free Radical Biology & Medicine**, v.66, p. 36- 44, 2014.

NUNES *et al.* Utilização do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais suínos inclusos em tecido ovariano. **Ciencia Animal Brasileira**.v.19, p.1-8, 2018.

OECD/FAO - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico “OECDFAO Agricultural Outlook”, Meat Consumption, 2020. Disponível em: <https://data.oecd.org/agroutput/meat-consumption.htm>. Acesso em: 30 jul. 2022.

OYAWOYE, O. *et al.* Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome. **Human Reproduction**, v.18, p.2270–2274, 2003.

PAES, V. M. *et al.* Effect of heat stress on the survival and development of *in vitro* cultured bovine preantral follicles and on *in vitro* maturation of cumulus–oocyte complex. **Theriogenology**, v. 86, n. 4, p. 994-1003, 2016.

PALOMINO G. *et al.* Induced-damages on preantral follicles by withanolide D, a potent chemotherapy candidate are not attenuated by melatonin. **Reprod Toxicol**. v.104, p.125-133. 2021.

PASSOS J.R.S, *et al.* Protein and messenger RNA expression of interleukin 1 system members in bovine ovarian follicles and effects of interleukin 1 β on primordial follicle activation and survival *in vitro*. **Domestic Animal Endocrinology**. v.54, p.48-59, 2016.

PAULINO, L. *et al.* Why is it so difficult to have competent oocytes from *in vitro* cultured preantral follicles? **Reprod Sci**. v. 29, n. 1, p. 1-14, 2022.

PETERS, AE. *et al.* Autophagy in female fertility: a role in oxidative stress and aging. **Antioxidant Redox Signal**. v.32, n.8, p. 550–568, 2020.

QIU, M. *et al.* The influence of ovarian stromal/theca cells during *in vitro* culture on steroidogenesis, proliferation and apoptosis of granulosa cells derived from the goat ovary. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 1, p. 170–176, 2014.

RAO, F. *et al.* Potential role of punicalagin against oxidative stress induced testicular damage. **Asian J Androl.** v.18, n.4, p.627-32.2016.

RASTELLI, G. *et al.* Repositioning Natural Products in Drug Discovery. **Molecules.** v. 25, n. 5, p.1154, 2020.

RODRIGUES, G.Q. *et al.* Bovine serum albumin improves *in vitro* development of caprine preantral follicles. **Anim. Reprod.**, v.7, n.4, p.382-388, 2010.

ROSSETTO, R. *et al.* Advances in preantral follicle isolation and culture systems. Brasília **Veterinary Act**, v.5, n.1, p.15-23, 2011.

ROSSETTO, R. *et al.* Effect of medium composition on *in vitro* cultivation of bovine preantral follicles: Morphology and viability do not guarantee functionality. **Zygote**, v.21, n. 2, p. 125-128, 2012.

RUSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibl. Anat.** v.24, p.77-92, 1983.

SAEED, M. *et al.* The promising pharmacological effects and therapeutic/medicinal applications of *Punica Granatum* L. (Pomegranate) as a functional food in humans and animals. **Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.**, v.12, n.1, p.24-38, 2018.

SALGADO, J. M. *et al.* Increased antioxidant content in juice enriched with dried extract of pomegranate (*Punica Granatum*) peel. **Plant Foods for Human Nutrition.** v. 67, n. 1, p. 39-43, 2012.

SANTOS, L. P. *et al.* Protein Localization of Epidermal Growth Factor in Sheep Ovaries and Improvement of Follicle Survival and Antrum Formation *in vitro*. **Reproduction in domestic animals.** v. 49, n. 5, p.783-789, 2014.

SARAIVA, M.V.A. *et al.* Expression of follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) in goat ovarian follicles and the impact of sequential culture medium on *in vitro* development of caprine preantral follicles. **Zygote**, v. 19, n. 03, p.205-214, 2010.

SEGHINSARA, M. A. *et al.* Panax ginseng extract Improves Follicular Development after Mouse Preantral Follicle 3D Culture. **Cell J**, v. 21, n.2, p.210-219, 2019.

SILVA, A. W. B. *et al.* Expression of TNF- α system members in bovine ovarian follicles and the effects of TNF- α or dexamethasone on preantral follicle survival, development and ultrastructure *in vitro*. **Animal Reproduction Science.** v. 182, p. 56-68, 2017.

SILVA, B. *et al.* Different Mechanisms to Control Oxidative Stress and Primordial Follicle Activation and Survival During *in vitro* Culture of Bovine Ovarian Tissue. **Social Science Research Network.** 2023.

SILVA-SANTOS, K. C. *et al.* Multiocyte follicles in adult mammalian ovaries. **Anim Reprod**, v. 8, p. 58-67, 2011.

SILVERTHORN, D. Unglaub. Fisiologi Humana. 7° edição. Brasil, **Artmed**, 2017.

SIMON LE, K.T.R.; DUNCAN, F.E. *In vitro* ovarian follicle growth: a comprehensive analysis of key protocol variables†. **Biol Reprod**. v.103, n.3, p.455-470, 2020.

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

SOTO-HERAS, S.; PARAMIO, M.T. Impact of oxidative stress on oocyte competence for *in vitro* embryo production programs. **Res. Vet. Sci.**, v.132, p.342-350, 2020.

SPITSCHAK, M.; HOEFLICH, A. Potential Functions of IGFBP-2 for Ovarian Folliculogenesis and Steroidogenesis. **Frontiers in Endocrinology**, [s.l.], v.9, p.1-10, 13 abr. 2018.

SUTTON M.L., Gilchrist R.B., Thompson J.G. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. **Hum. Reprod. Update**. v.9, p.35–48, 2003.

TAHERI R. *et al.* The effect of pomegranate fresh juice versus pomegranate seed powder on metabolic indices, lipid profile, inflammatory biomarkers, and the histopathology of pancreatic islets of Langerhans in streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetic Sprague-Dawley rats. **BMC Complement**. v.17, n.1, 2017.

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

TANABE, H. *et al.* Melatonin protects the integrity of granulosa cells by reducing oxidative stress in nuclei, mitochondria, and plasma membranes in mice. **The Journal of reproduction and development**. v. 61, n. 1, p.35-41, 2015.

TANG, D. *et al.* The molecular machinery of regulated cell death. **Cell research**. v.29, n.5, p. 347-364, 2019.

TANG, J. *et al.* Punicalagin supresses the proliferation and invasion of cervical câncer cells through inhibition of the beta-catenin patway. **Department of Gynaecology and Obstetrics. Renmin Hospital of Wuhan University**. Wuhan, Hubei 430060, P.R. China. 2017.

TELFER EE, ANDERSEN CY. *In vitro* growth and maturation of primordial follicles and immature oocytes. **Fertil Steril**. v.115, n.5, p.1116-1125, 2021.

VASCONCELOS, E.M. *et al.* Eugenol influences the expression of messenger RNAs for superoxide dismutase and glutathione peroxidase 1 in bovine secondary follicles cultured *in vitro*. **Zygote**. v.18, p.1-6, 2020.

VASCONCELOS, S. M. L. *et al.* Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VITALE I. *et al.* Apoptotic cell death in disease-Current understanding of the NCCD 2023. **Cell Death Differ.** v.30, n.5, p.1097-1154, 2023.

VOMUND S. *et al.* Nrf2, the Master Regulator of Anti-Oxidative Responses. **Int J Mol Sci.** 2017 v.20, n.12, p.2772, 2017.

VON MENGDEN, L.; KLAMT, F.; SMITZ, J. Redox Biology of Human Cumulus Cells: Conceitos Básicos, Impacto na Qualidade dos Oócitos e Potencial Uso Clínico. **Sinal Redox Antioxidante**, v. 32, n.8, p. 522-535, 2020.

WANG, Z. *et al.* Review on cell models to evaluate the potential antioxidant activity of polysaccharides. **Food & Function**, v.8, n. 3, p. 915-926, 2017.

WEBB, E.C. *et al.* Age effects and the influence of varying proportions of terrestrial and marine dietary protein on the stable nitrogen-isotope compositions of pig bone collagen and soft tissues from a controlled feeding experiment. **Sci. Technol. Archaeol Res.**, v.2, n. 1, p.54-66, 2016.

XIAO S. *et al.* Dexmedetomidine attenuates airway inflammation and oxidative stress in asthma via the Nrf2 signaling pathway. **Mol Med Rep.** v.27, n.2, 2023.

YAMASHIRO, C. *et al.* Generation of human oogonia from induced pluripotent stem cells *in vitro*. **Science**, v. 362, n. 6412, p. 356-360, 2018.

YAN C. *et al.* Punicalagin attenuates palmitate-induced lipotoxicity in HepG2 cells by activating the Keap1-Nrf2 antioxidant defense system. **Mol Nutr Food Res.** v.60 n.5, p. 1139-49, 2016.

YANG L. *et al.* The Role of Oxidative Stress and Natural Antioxidants in Ovarian Aging. **Frontiers in Pharmacology**. v.11, p. 1663-9812, 2021.

YANPAR E. *et al.* Possible protective role of punicalagin on oxidative stress, inflammation and genotoxicity in ethanol-induced liver toxicity. **J.Res.Pharm.** v.25, n.5, p. 600-608, 2021.

YE, M *et al.* Punicalagin protects H9c2 cardiomyocytes from doxorubicin-induced toxicity through activation of Nrf2/HO-1 signaling." **Bioscience reports** vol. 39, n.5 2019.

YEUNG, C. *et al.* BRE modulates granulosa cell death to affect ovarian follicle development and atresia in the mouse. **Cell death & disease.** v. 8, n.3, 2017.

YI LI, *et al.* Pomegranate peel-derived punicalagin: Ultrasonic-assisted extraction, purification, and its α -glucosidase inhibitory mechanism. Research Center

for Plants and Human Health, Institute of Urban Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chengdu National Agricultural Science & Technology center, Chengdu 610213, China. **Food Chemistry**, v.413, n.374, p.2, 2022.

YOSHIHARA, D. *et al.* Protective role of glutathione S-transferase A4 induced in copper/zinc-superoxide dismutase knockout mice. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 47, p. 559-567, 2009.

ZAIDI, S. *et al.* "SOD2 deficiency-induced oxidative stress attenuates steroidogenesis in mouse ovarian granulosa cells. **Molecular and cellular endocrinology**. v.519 (2021).

ZHANG Y, *et al.* Punicalagin Protects against Diabetic Liver Injury by Upregulating Mitophagy and Antioxidant Enzyme Activities. **Nutrients**. v. 6, n.14, 2022.

ZHANG, L. *et al.* Adipose-specific ablation of Nrf2 transiently delayed high-fat diet-induced obesity by altering glucose, lipid and energy metabolism of male mice. **American journal of translational research**. v.8, p. 5309- 5319, 2016.

ZOHEIR KA, *et al.* Effect of alpha lipoic acid on *in vitro* development of bovine secondary preantral follicles. **Theriogenology**. v,88, p.124–130, 2017.