



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

MARIA ALICE FELIPE OLIVEIRA

**EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DA CASCA DE *Punica granatum* L. (ROMÃ) NO
CULTIVO IN VITRO DE TECIDO OVARIANO BOVINO**

SOBRAL

2024

MARIA ALICE FELIPE OLIVEIRA

EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DA CASCA DE *Punica granatum* L. (ROMÃ) NO
CULTIVO IN VITRO DE TECIDO OVARIANO BOVINO

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

Orientador: Prof. Dr. Valdevane Rocha Araújo
Coorientador: Prof. Dr. José Roberto Viana
Silva

SOBRAL

2024

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

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

O48e Oliveira, Maria Alice Felipe.
 Efeito do extrato etanólico da casca de *Punica granatum* L. (Romã) no cultivo in vitro de tecido ovariano bovino / Maria Alice Felipe Oliveira. – 2024.
 62 f. : il. color.

 Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2024.

 Orientação: Profa. Dra. Valdevane
 Rocha Araújo. Coorientação: Prof. Dr.
 José Roberto Viana Silva.

 1. Cultivo in situ. 2. antioxidantes. 3. punicalagina. I. Título.

CDD 660.6

MARIA ALICE FELIPE OLIVEIRA

EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DA CASCA DE *Punica granatum* L. (ROMÃ) NO
CULTIVO IN VITRO DE TECIDO OVARIANO BOVINO

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

Aprovada em: 05/03/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr.^a. Valdevane Rocha Araújo (Orientadora)
Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPa)

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

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

Prof. Dr. Renato Felix da Silva (Examinador)
Centro Universitário 7 de Setembro (UNI7)

*À Deus, por me permitir percorrer essa
trajetória até o presente momento.
Aos meus pais, Maria Elisane Felipe de
Sousa e Francisco Oliveira da Costa, à
minha irmã Karine Felipe Oliveira, aos
meus amigos e à minha família científica.*

Com amor.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer a Ele. Nesses 20 meses de mestrado foram muitas as adversidades e com certeza Ele me ouviu quando eu pedi forças para continuar. Ao longo da minha caminhada na pesquisa e desde sempre na minha vida pude contar com a ajuda da minha família. Minha mãe, Maria Elisane Felipe de Souza, que sempre olhou por mim e nunca deixou que nossas dificuldades financeiras me impedissem de seguir esse sonho. Meu pai, Francisco Oliveira da Costa, que sempre trabalhou muito investir na minha educação. Minha irmã, Karine Felipe Oliveira, que foi minha inspiração na infância e adolescência e hoje em dia se tornou uma das melhores parceiras que eu poderia ter. À minha família, a minha eterna gratidão.

Não poderia deixar de citar também o Professor Edmar Pinheiro. Este que me falou sobre Geografia no ensino fundamental, mas seus ensinamentos ultrapassaram as paredes da escola. Em momentos de necessidade, foi professor e amigo, ajudou a mim e a minha família em momentos de necessidade e garantiu um ano de estudos na minha antiga escolinha de bairro e sempre me motivou a estudar. Sem a ajuda dele provavelmente eu não estaria aqui.

Gostaria de agradecer aos meus amigos da época de graduação, pois foi nesse período da minha formação acadêmica que cresci exponencialmente como professora e pesquisadora em formação. Em especial a Amanda Rayane e Layla Cely que são em minha vida muito mais que amigas, já são parte de minha família, e durante a graduação e o mestrado sem o apoio delas eu não teria ido muito longe. Ao meu antigo laboratório, LABIEX, onde pude conhecer pessoas fantásticas como Paulo Elesson, Denner Silvino, Isabele Pereira e o Jonathan Elias, que muito me ensinaram e que até hoje com eles eu aprendo.

Nesses 4 anos de graduação e 20 meses de mestrado, seguindo para o doutorado, encontrei uma professora que me ouviu e que me acolheu e me acolhe de igual para igual. Que sempre estimulou minhas ideias, mesmo que meio loucas, e sempre me incentivou a seguir aprendendo a fazer pesquisa com ela. Professora Valdevane, não existem palavras que possam expressar o quando eu sou grata por todos os ensinamentos, por todas as vezes que a senhora pegou em minha mão para me ensinar algo e pelos puxões de orelha. Obrigada por acreditar em mim. Meu agradecimento a equipe que ajudou na execução dos experimentos: Igo Teixeira, Venância Azevedo e Francisco das Chagas. Além disso, não poderia deixar de citar meus amigos e parceiros de pesquisa que sempre estiveram comigo: Solano Martins, João Eudes, Fernanda Lima, Ana Normélia e toda a equipe Fisiorep.

Por fim, o presente trabalho não poderia ter acontecido sem o auxílio de nossos professores mais que parceiros! Professor Anderson Weiny que sempre exala alegria e

acolhimento, muito obrigada por sempre nos receber tão bem quando vamos a Sobral. À professora Queli Cristina Fidelis que muito nos ensinou e ensina sobre química de produtos naturais. E aos professores José Roberto Viana Silva e Vânia Marilande Ceccatto por cederem os laboratórios para a execução dos experimentos e das análises realizadas para o presente estudo.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi investigar o potencial antioxidante do extrato etanólico produzido a partir da casca do fruto da romã (*Punica granatum* L.) sobre o tecido ovariano bovino cultivado *in vitro*. O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética sob o protocolo de nº 09326942/2021. Para a produção do extrato, frutas frescas e oriundas de mercado local foram coletadas e as cascas foram retiradas do fruto e submersas em etanol (PA 99,8%) por 5 dias. Finalmente, o extrato obtido foi liofilizado, diluído em água ultrapura e armazenado a -20°C. No extrato, foi avaliada a capacidade antioxidante total (DPPH e ABTS) e a composição química definida através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de Ultravioleta-Visível (CLAE-UV-Vis). Ademais, os ovários (n=24) de vacas sem raça definida foram coletados e transportados ao laboratório em solução salina com penicilina e estreptomicina a 4 °C. No laboratório, os córtex ovarianos foram fragmentados e posteriormente cultivados por 6 dias em meio α MEM adicionado de ITS (10 μ g/mL de insulina, 5,5 μ g/mL de transferrina e 5 ng/mL de selênio), BSA (1,25 mg/mL), Glutamina e Hipoxantina (α MEM⁺), na ausência (controle cultivado) ou presença de diferentes concentrações (10, 50, e 100 μ g/mL) do extrato etanólico de *Punica granatum* L. (EE-cPG). O cultivo foi realizado em incubadora a 38,5 °C e atmosfera umidificada a 5% de CO₂. Após 5 dias, os fragmentos foram destinados às análises morfológicas (histologia clássica e ultraestrutura) e análises bioquímicas (atividade das enzimas SOD e CAT, conteúdo de tióis reduzidos (GSH) e quantificação dos níveis de malondialdeído). Foi utilizada a análise de variância (ANOVA), com post-hoc de Tukey ou Mann-Whitney, respeitando o teste de normalidade. O valor de P<0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Como resultados, encontrou-se a presença da α -punicalagina no extrato etanólico produzido. Além disso, 50 e 100 μ g/mL de EE-cPG apresentaram capacidade antioxidante total significativamente superior ao longo do cultivo (D2 e D6) quando comparado ao tratamento com 10 μ g/mL de EE-cPG. Essas mesmas concentrações foram capazes de diminuir os níveis de MDA e aumentar os níveis de Tiol. Contudo, somente a concentração de 100 μ g/mL foi capaz de manter o percentual de folículos morfolologicamente normais semelhante aos controles fresco e cultivado, além de promover ativação e preservar a integridade ultraestrutural folicular. Portanto, o extrato etanólico da casca do fruto da romã foi capaz de preservar a morfologia e ultraestrutura de folículos pré-antrais bovinos, além de manter o equilíbrio redox. Dentre as concentrações avaliadas, a de 100 μ g/mL se destaca por ter sido capaz de manter a morfologia folicular e evitar o estresse oxidativo.

Palavras-chaves: Cultivo *in situ*; antioxidantes; Punicalagina.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the antioxidant potential of the ethanolic extract produced from the peel of pomegranate fruit (*Punica granatum* L.) on bovine ovarian tissue cultured *in vitro*. The present study was approved by the ethics committee under protocol number 09326942/2021. For the extract production, fresh fruits from the local market were collected, and the peels were removed from the fruit and immersed in ethanol (99.8% PA) for 5 days. Finally, the obtained extract was lyophilized, diluted in ultrapure water, and stored at -20°C. The antioxidant capacity of the extract was evaluated (DPPH and ABTS), and its chemical composition was determined through High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet-Visible Detector (HPLC-UV-Vis). Additionally, ovaries (n=24) from crossbred cows were collected and transported to the laboratory in saline solution with penicillin and streptomycin at 4°C. In the laboratory, ovarian cortices were fragmented and cultured for 6 days in α MEM medium supplemented with ITS (10 μ g/mL insulin, 5.5 μ g/mL transferrin, and 5 ng/mL selenium), BSA (1.25 mg/mL), Glutamine, and Hypoxanthine (α MEM+), in the absence (cultured control) or presence of different concentrations (10, 50, and 100 μ g/mL) of ethanolic extract of *Punica granatum* L. (EE-cPG). The culture was performed in an incubator at 38.5°C and 5% CO₂ humidified atmosphere. After 5 days, the fragments were subjected to morphological (classical histology and ultrastructure) and biochemical analyses (SOD and CAT enzyme activity, reduced thiol content (GSH), and quantification of malondialdehyde levels). Analysis of variance (ANOVA), with Tukey or Mann-Whitney post-hoc tests, respecting the normality test, was used. A P value < 0.05 was considered statistically significant. Results revealed the presence of α -punicalagin in the produced ethanolic extract. Moreover, 50 and 100 μ g/mL of EE-cPG showed significantly higher total antioxidant capacity throughout the culture (D2 and D6) compared to the 10 μ g/mL EE-cPG treatment. These same concentrations were able to decrease MDA levels and increase Thiol levels. However, only the concentration of 100 μ g/mL was able to maintain the percentage of morphologically normal follicles similar to fresh and cultured controls, besides promoting activation and preserving follicular ultrastructural integrity. Therefore, the ethanolic extract from pomegranate fruit peel was able to preserve the morphology and ultrastructure of bovine preantral follicles, in addition to maintaining redox balance. Among the evaluated concentrations, 100 μ g/mL stands out for maintaining follicular morphology and preventing oxidative stress.

Keywords: In situ culture; antioxidants; Punicalagin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Corte histológico do ovário.....	15
Figura 2	Etapas do processo de ativação e desenvolvimento folicular.....	17
Figura 3	Redução do oxigênio molecular (O ₂) até a formação de água (H ₂ O).....	18
Figura 4	Superprodução de EROs (1) ocasionando estresse oxidativo (2) devido à redução dos compostos antioxidantes intracelulares (3) promovendo diversas alterações: peroxidação lipídica (4), fragmentação do DNA (5) e oxidação de diferentes moléculas, levando a célula à morte.....	19
Figura 5	Mecanismos de ação das enzimas antioxidantes para controlar o estresse oxidativo. SOD: superóxido dismutase, GR: glutathiona redutase, GSH e GSSG: formas reduzida e oxidada da glutathiona; CAT: catalase; DNA: ácido desoxirribonucleico; RNA: ácido ribonucleico.....	20
Figura 6	Interconversão de glutathiona nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutathiona peroxidase (GSH-Px), glutathiona oxidase (GO) e glutathiona redutase (GR).....	20
Figura 7	Mecanismo de ação da Punicalagina (PU) contra toxicidade inducida por DOX em cardiomiócitos H9C2.....	22
Figura 8	Isoformas α -e β - da punicalagina, composto majoritário da Romã, e os grupamentos hidroxila ao redor da molécula.....	23
Figura 1	Cromatograma de CLAE-UV-Vis do extrato etanólico da casca de romã em 254 nm.....	40
Figura 2	Sobreposição de cromatogramas de CLAE-UV-Vis do extrato etanólico (cor vermelha) e do padrão α - e β -punicalagina (cor preta), em 254 nm.....	40
Figura 3	Capacidade antioxidante total do extrato etanólico de <i>Punica granatum L.</i> em diferentes concentrações (10, 50 e 100 μ g/mL) no meio de cultivo <i>in vitro</i> em diferentes dias. ^{ABC} Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os diferentes tratamentos no mesmo dia de cultivo (P<0.05). ^{ab} Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas no mesmo tratamento em diferentes dias de cultivo (P<0.05).....	41
Figura 4	Atividade das enzimas superóxido dismutase (A) e catalase (B) em tecido ovariano bovino não cultivado (FC) ou cultivado na ausência (α -MEM ⁺) ou na presença de diferentes concentrações do EE-cPG (10, 50 e 100 μ g/mL) após 6 dias de cultivo. ^{ABC} Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os diferentes tratamentos no mesmo dia de cultivo (P<0.05). ^{ab} Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas no mesmo tratamento em diferentes dias de cultivo (P<0.05).....	42
Figura 5	Conteúdo de malondialdeído em tecido ovariano bovino não cultivado (FC) ou cultivado na ausência (α -MEM ⁺) ou na presença de diferentes concentrações do EE-cPG (10, 50 e 100 μ g/mL) após 6 dias de cultivo. ^{ABC} Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os diferentes tratamentos no mesmo dia de cultivo (P<0.05). ^{ab} Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas no mesmo tratamento em diferentes dias de cultivo (P<0.05).....	43
Figura 6	Conteúdo de Tiol em tecido ovariano bovino não cultivado (FC) ou cultivado na ausência (α -MEM ⁺) ou na presença de diferentes concentrações do EE-cPG (10, 50 e 100 μ g/mL) após 6 dias de cultivo. ^{ABC} Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os diferentes tratamentos no mesmo dia de cultivo (P<0.05). ^{ab} Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas no mesmo tratamento em diferentes dias de cultivo (P<0.05).....	44

Figura 7	Percentual de folículos morfolologicamente normais em tecido ovariano bovino não cultivado (FC) ou cultivado na ausência (α -MEM ⁺) ou na presença de diferentes concentrações do EE-cPG (10, 50 e 100 μ g/mL) após 6 dias de cultivo. ^{ABC} Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os diferentes tratamentos no mesmo dia de cultivo ($P < 0.05$). ^{ab} Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas no mesmo tratamento em diferentes dias de cultivo ($P < 0.05$)......	44
Figura 8	Percentual de folículos primordiais e em desenvolvimento em tecido ovariano não cultivado (FC) ou cultivado na ausência (α -MEM ⁺) ou na presença de diferentes concentrações do EE-cPG (10, 50 e 100 μ g/mL) após 6 dias de cultivo. ^{ABC} Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os diferentes tratamentos no mesmo dia de cultivo ($P < 0.05$). ^{ab} Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas no mesmo tratamento em diferentes dias de cultivo ($P < 0.05$)......	45
Figura 9	Eletromicrografia de tecido ovariano bovino cultivado por 6 dias. (A) Controle fresco (1500x), (B) α -MEM ⁺ (1500x), (C) 10 μ g/mL de EE-cPG (1200x) e (D) 100 μ g/mL de EE-cPG GC (1000x): GC: Granulosa cell; G: Golgi complex; NU: Oocyte nucleus; m: mitochondria; er: endoplasmic reticulum; v: vesicle.....	46
Figura 10	Fibras de colágeno em tecido ovariano não cultivado (FC) ou cultivado na ausência (α -MEM ⁺) ou na presença de diferentes concentrações do EE-cPG (10, 50 e 100 μ g/mL) após 6 dias de cultivo. ^{ABC} Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os diferentes tratamentos no mesmo dia de cultivo ($P < 0.05$). ^{ab} Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas no mesmo tratamento em diferentes dias de cultivo ($P < 0.05$)......	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'- azino-bis (3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid)
AE	Ácido elágico
<i>Bcl-2</i>	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BSA	<i>Bovine sérum albumine</i>
CAT	Catalase
D0	Dia zero
D6	Dia seis
DOX	Doxorrubicina
DPPH	5,5'-ditiobis- (ácido 2-nitrobenzóico)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EtOH	Extrato etanólico
FSH	Hormônio folículo estimulante
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduzida
GSSH	Glutathione oxidada
Gpx4	Glutathione peroxidase 4
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
ISCB	Instituto superior de ciências biomédicas
Kh ₂ po ₄	Fosfato monopatássico
LABIEX	Laboratório de bioquímica e expressão gênica
LH	Hormônio luteinizante
αMEM	Meio essencial mínimo modificado
MDA	Malondialdeído
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotamida e adenine
Nfe212	NFE2 como BZIP fator de transcrição 2
NTB2	2-nitro-5-thiobenzoate
PU	Punicalagina
Prdx1	Peroxisredoxina 1
SOD	Superóxido dismutase
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
UECE	Universidade Estadual do Ceará
UFC	Universidade Federal do Ceará

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Alfa
β	Beta
%	Porcentagem
<	Menor que
%	Porcentagem
μg	Micrograma
μm	Micrometro
g	Gramas
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
°C	Grau Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	Fisiologia reprodutiva feminina e as biotécnicas da reprodução.....	15
2.2	Estresse oxidativo durante o cultivo <i>in vitro</i> de tecido ovariano.....	18
2.3	<i>Punica granatum</i>: constituição química e principais atividades biológicas..	21
2.4	<i>Punica granatum</i> e seus efeitos antioxidantes no sistema reprodutor feminino.....	22
3	JUSTIFICATIVA.....	25
4	HIPÓTESE CIENTÍFICA.....	27
5	OBJETIVOS.....	28
5.1	Geral.....	28
5.2	Específicos.....	28
6	Capítulo 1: Extrato etanólico da casca da romã (<i>Punica granatum</i> L.) evita estresse oxidativo e preserva a morfologia de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano bovino cultivado <i>in vitro</i>.....	29
7	CONCLUSÃO.....	53
8	PERSPECTIVAS.....	54
9	REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor e maior exportador de carne bovina do mundo. Nesse contexto, a bovinocultura se destaca por possuir relevante papel na agroindústria e economia do país, uma vez que gera empregos em todo território brasileiro e fornece diversos produtos de origem animal para o mercado local, nacional e internacional (Embrapa, 2020). Contudo, existem limitações que dificultam uma maior produção dos animais dessa espécie.

Dentre os fatores que dificultam os avanços na área da produção e melhoramento genético em bovinos está o limitado conhecimento acerca dos mecanismos que regulam as etapas de crescimento e desenvolvimento folicular. Nesse contexto, as biotécnicas reprodutivas podem ser empregadas na busca de uma melhor compreensão acerca dos mecanismos que medeiam a foliculogênese para que se possa obter, futuramente, embriões produzidos a partir do cultivo de folículos pré-antrais (Gupta; Nandi, 2012).

Em outros animais de produção, como caprinos (Magalhães *et al.*, 2011), ovinos (Arunakumari, Shanmugasundaram, Rao, 2010) e suínos (Wu, Benjamin, Carrell, 2001), o cultivo *in vitro* de folículos secundários resultou na produção de oócitos maduros que posteriormente foram fecundados gerando embriões. Já na espécie bovina, os folículos pré-antrais que foram isolados e cultivados somente progrediram até o estágio antral (McLaughlin *et al.*, 2010; Araújo *et al.*, 2014; Cunha *et al.*, 2018).

Dentre as ferramentas biotecnológicas utilizadas, está o cultivo de folículos pré-antrais, isolados ou não do córtex ovariano, que vem sendo utilizado de forma promissora para investigar possíveis substâncias que possam potencializar o crescimento e desenvolvimento folicular e a produção de embriões *in vitro*. Porém, tais folículos e gametas podem sofrer danos com o estresse oxidativo induzido pelas próprias condições do cultivo *in vitro*, como a variação de temperatura e exposição excessiva à luz (Luz *et al.*, 2011; Silva; Silva, 2023).

Devido a isso, assim como a presente dissertação, os estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de investigar compostos que sejam adicionados ao meio de cultivo e que possam amenizar os efeitos deletérios causados pelas condições do cultivo *in vitro*. Nesse contexto, substâncias de origem vegetal e seu potencial antioxidante são alvos constante de investigação científica, como a *Cimifuga racemosa* (De Assis *et al.*, 2023) e a *Amburana cearensis* (Gouveia *et al.*, 2016). Dentre estes vegetais estudados está a *Punica granatum* L. (romã), espécie bem conhecida pela medicina tradicional, porém pouco estudada dentro do contexto das biotécnicas reprodutivas.

A *Punica granatum* L., é rica em compostos fenólicos (compostos químicos que contêm pelo menos um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxila (-OH) ligados a ele), e dentre estes compostos encontrados na romã, a Punicalagina (PU) e o Ácido Elágico (AE) estão presentes em maior quantidade no fruto e são responsáveis por benefícios, como atividade antioxidante e antitumoral (Seeram, Lee e Heber, 2004; Liu *et al.*, 2017). A associação desses constituintes demonstra ser

sinérgica e de potencial medicinal superior quando comparada a sua utilização de forma individual. Devido a isso, os estudos desenvolvidos avaliaram as propriedades de extratos produzidos a partir de diferentes partes da planta (Ahmed e Yang, 2017; Saeed *et al.*, 2018).

Recentemente, foi relatado o potencial efeito inibitório dos compostos ácido elágico na proliferação e migração de células cancerosas do ovário. Dessa forma, de acordo com os achados, estes compostos, presentes em grande quantidade na romã, possivelmente atuam regulando vias celulares de crescimento e apoptose (Liu *et al.*, 2017; Bellusci *et al.*, 2019). É provável que os efeitos antioxidantes dos compostos fenólicos da romã ocorram devido a presença de grupos funcionais hidroxila em torno da estrutura nuclear dos compostos majoritários (Punicalagina e ácido elágico), os quais são potentes doadores de elétrons (Kulkarnia; Aradhyaa e Divakarb, 2004). Dentre os estudos realizados até o momento, as soluções produzidas a partir da casca ou da semente dos frutos de *Punica granatum*, apresentam, dentre outros efeitos, principalmente o antioxidante (Ammar *et al.*, 2017; Khalaf *et al.*, 2019; Chan *et al.*, 2021).

Embora já se tenham trabalhos que demonstram os efeitos antioxidantes da romã, são escassos os estudos que avaliam os efeitos dessa planta em vias antioxidantes no tecido reprodutor feminino. Dessa forma, este estudo torna-se necessário para elucidar o possível efeito antioxidante que o extrato etanólico da casca do fruto de *Punica granatum* possa causar no tecido ovariano bovino cultivado *in vitro*. Considerando a importância e para um maior esclarecimento deste trabalho, a revisão de literatura a seguir abordará os aspectos relacionados à fisiologia reprodutiva feminina e as biotécnicas da reprodução, o estresse oxidativo durante o cultivo *in vitro* de tecido ovariano e constituição química e principais atividades biológicas da *Punica granatum*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fisiologia reprodutiva feminina e as biotécnicas da reprodução

Em mamíferos, o sistema reprodutor feminino é constituído basicamente pelo útero, e um par de gônadas chamadas de ovários. Essas gônadas, que são o foco deste trabalho, podem ser divididas em duas porções: região medular do ovário, rica em elementos neurovasculares, e região cortical do ovário, local rico em células somáticas chamadas de estroma, onde pode-se identificar a presença dos folículos ovarianos (SHAH *et al.*, 2018).

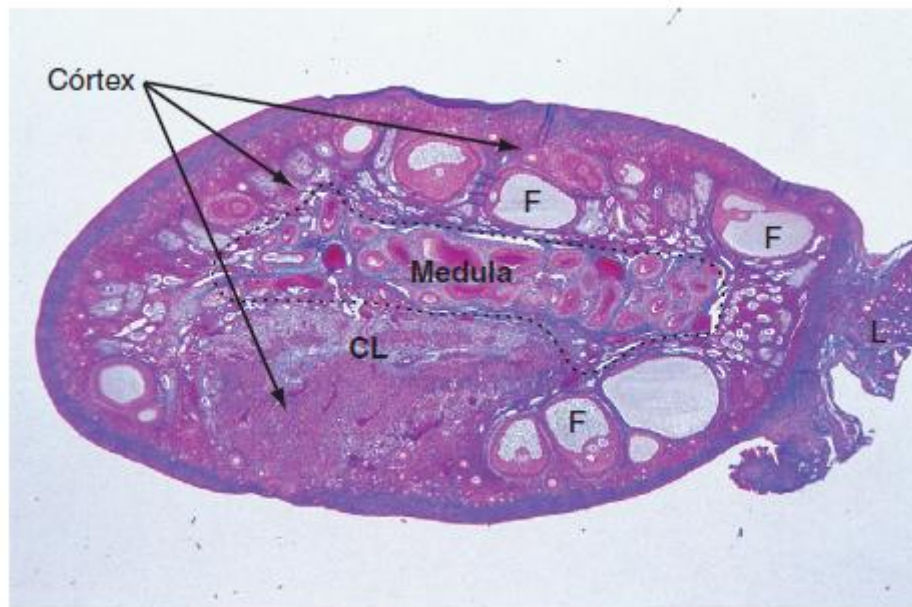


Figura 01 – Corte histológico do ovário. CL: Corpo lúteo; F: Folículo; L: Ligamento. Fonte: Berne e Levy, 2009.

O folículo ovariano são considerados a unidade funcional do ovário, possuindo caráter gametogênico e endócrino, além de também abrigar o oócito, gameta feminino, durante o seu processo de crescimento e desenvolvimento até o momento em que ele estará maduro o suficiente para ser liberado e fertilizado. Durante esse processo de desenvolvimento, os folículos ovarianos passam pelos seguintes estágios: folículo primordial quiescente, folículo pré-antral (primário e secundário), folículo antral (terciário) em crescimento, folículo dominante (pré-ovulatório, graafiano), corpo lúteo e corpo albicans (Araújo *et al.*, 2014).

Em cada estágio folicular acima citado, as estruturas foliculares passam por mudanças fisiológicas reguladas pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal que é responsável pela secreção de hormônios, como o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH), que estimulam o crescimento e desenvolvimento folicular. A oogênese, processo de desenvolvimento do oócito, tem início ainda na vida fetal da fêmea. Nesse momento, no ovário, há a formação da população de oogônias através de sucessivas mitoses. Posteriormente, estas se diferenciam em oócitos primários

que, juntamente com células pavimentosas do estroma aderidas ao seu redor, compõem a chamada reserva ovariana. A esta estrutura formada pela união entre os oócitos primários e as células pavimentosas da-se o nome de folículo primordial.

A Foliculogênese é iniciada quando estes folículos primordiais saírem do seu estado de quiescência através de mecanismos de ativação e passarem para o estágio de folículo primário. Em paralelo, oócito e células foliculares secretam substâncias químicas que induzem mutuamente a diferenciação celular entre si. O oócito primário dá origem a duas células distintas: oócito secundário e 1º corpúsculo polar e, nesse momento, cada célula possui 23 cromossomos. É, então, iniciada a etapa da oogênese denominada meiose, onde além da divisão do material genético, eventos importantes como o crossing-over garantem a variabilidade genética e continuidade da espécie. Após estar completamente maduro, esse oócito é liberado e somente finaliza a meiose caso seja fertilizado (Cortvrindt et al., 2011).

Já em paralelo aos eventos da oogênese, o desenvolvimento do folículo também ocorre em resposta ao crescimento do gameta. Após serem ativados, os folículos que compõem a reserva ovariana (folículos primordiais) passam para o estágio de folículo primário, sendo este caracterizado por um oócito recoberto por uma única camada de células pavimentosas da granulosa. Posteriormente, esse folículo irá se diferenciar em folículo secundário, onde tais células da granulosa passam a formar mais de uma camada e adquirem formato cuboide. Nesse estágio do desenvolvimento, tais células da granulosa estão em alta atividade metabólica, o que faz com que elas secretem para o meio interno do folículo um líquido que preencherá a cavidade antral, marcando assim a passagem de folículo secundário para folículo terciário. Este último é caracterizado por possuir a maior parte tomada pelo líquido antral e por posicionar o oócito na periferia do folículo. Nesse etapa o folículo está prestes a ser rompido pelo oócito para que a ovulação ocorra (Baerwald *et al.*, 2012).

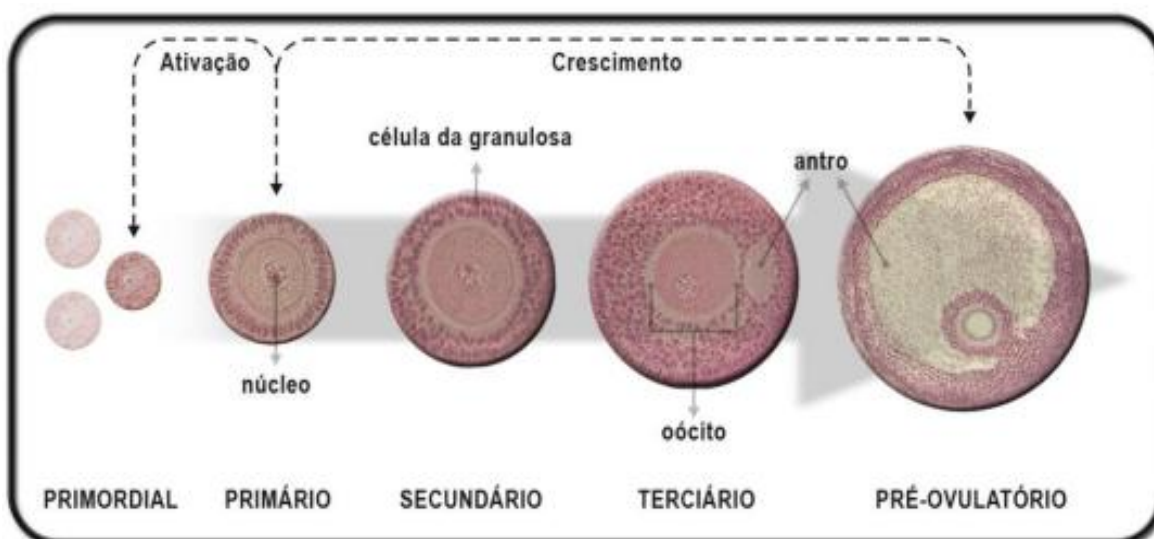


Figura 02- Etapas do processo de ativação e desenvolvimento folicular. Fonte: Rossetto *et al.*, 2011.

Os eventos da oogênese e foliculogênese são complexos e podem sofrer danos e interferências de fatores ambientais. Frente a tais desafios, o desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas como a criopreservação e o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, bem como a maturação e fertilização *in vitro* de oócitos, são importantes para otimizar a utilização do potencial oocitário e contribuem para elevar a produção de *in vitro* de espécies de alto interesse económico. Vários estudos têm mostrado que o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais tem um grande potencial para fornecer um grande número de oócitos para fertilização *in vitro* (Bertoldo *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2016; Telfer, 2019).

Em vista disso, torna-se necessário aperfeiçoar o sistema onde o cultivo *in vitro* ocorre. Apesar de se acumularem décadas de trabalho, apenas em camundongos se observou um completo desenvolvimento folicular (O'Brien *et al.* 2003), enquanto que a obtenção de oócitos competentes após cultivo *in vitro* de folículos ainda não foi observado em animais domésticos. Uma das condições que limita o desenvolvimento folicular é a produção em excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs), um tipo de radical livre, que são moléculas altamente reativas com capacidade de oxidar estruturas intracelulares como a membrana celular, DNA e RNA (Waiz *et al.*, 2016).

2.2 Estresse oxidativo durante o cultivo *in vitro* de tecido ovariano

Em animais domésticos e humanos, o sucesso na obtenção de oócitos competentes após o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, inclusos ou não em córtex ovariano, ainda é limitado (Nascimento *et al.*, 2023). Em um sistema de cultura de longo prazo (32 semanas) de folículos pré-antrais humanos, Fabbri *et al.* (2007) relataram crescimento folicular e sobrevivência, mas os oócitos não estavam aptos a fertilização. Em um sistema de cultivo *in vitro*, os folículos são mantidos em condições diferentes de seu ambiente natural e precisam de condições adequadas para sobreviver e se desenvolver. *In vitro*, os folículos pré-antrais são expostos a concentrações suprafisiológicas de oxigênio (SÁ *et al.*, 2017), o que pode resultar na formação excessiva de radicais livres (Del Collado *et al.*, 2017).

Espécies Reativa de Oxigênio são moléculas derivadas do oxigênio formam as espécies reativas do oxigênio (EROs) que precedem os radicais livres (Figura 03). Os radicais livres são formas moleculares caracterizadas pelo desemparelhamento de um ou mais elétrons em sua estrutura (Luz *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2022).

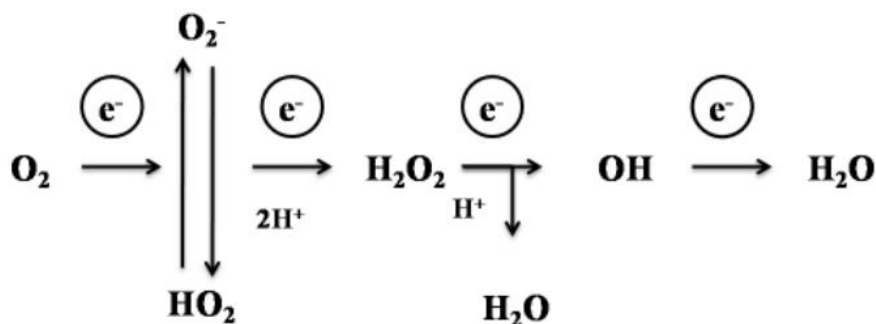


Figura 03- Redução do oxigênio molecular (O_2) até a formação de água (H_2O). Várias espécies reativas de oxigênio (EROs) são formadas nesse processo, como o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH). Fonte: Luz *et al.* 2011.

O desequilíbrio entre a produção e eliminação dessas espécies em células cultivadas *in vitro* resulta no estresse oxidativo, podendo comprometer biomoléculas como proteínas, DNA, RNA e componentes das membranas celulares (Figura 04) (Filipovic *et al.*, 2015; Barreiros, David, 2006). Além disso, os radicais livres também podem interagir com os lipídeos, sejam eles livres ou de membrana, ocasionando a peroxidação lipídica. Nesse processo, ocorre a interação de ácidos graxos insaturados com o radical hidroxila (OH) e os produtos dessa reação, como o malondialdeído (MDA), são moléculas relativamente estáveis e capazes de estabelecer ligações com as proteínas e o DNA, causando alterações em sua conformação e funções (Costa *et al.*, 2022). Vários outros fatores estão associados ao estresse oxidativo *in vitro*, como a alta concentração de glicose, variação na osmolaridade média, exposição excessiva à luz e ausência de combinação eficiente de antioxidantes (Soto-heras, Paramio, 2020). Nesse sentido, o controle rigoroso das condições de cultivo e a combinação específica de antioxidantes em cada etapa do desenvolvimento folicular são necessários para reduzir o estresse oxidativo durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais.

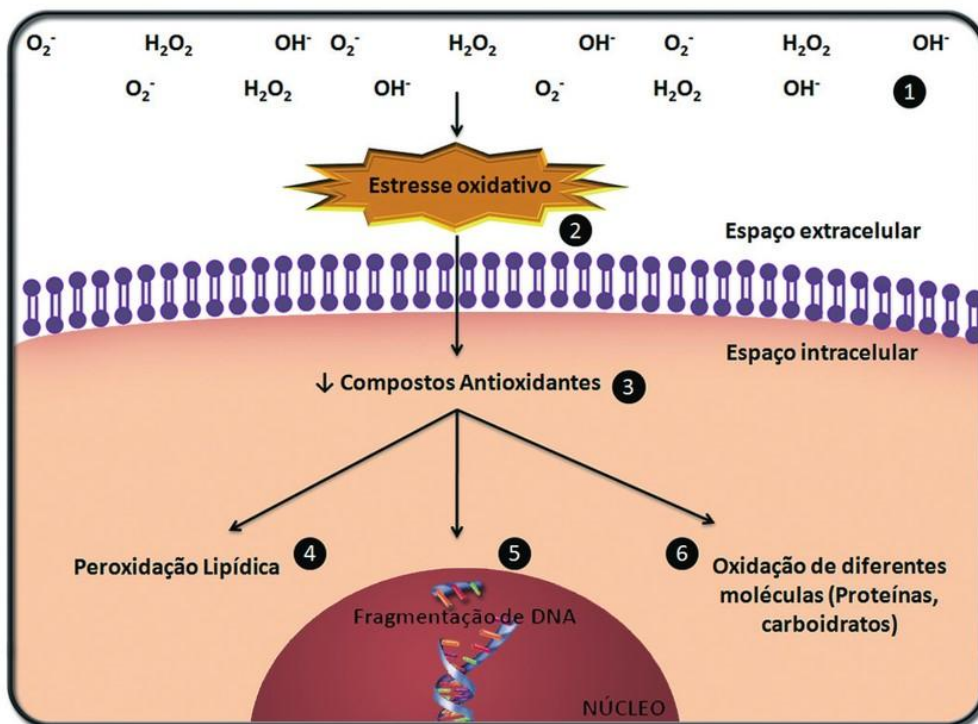


Figura 04 - Superprodução de EROs (1) ocasionando estresse oxidativo (2) devido à redução dos compostos antioxidantes intracelulares (3) promovendo diversas alterações: peroxidação lipídica (4), fragmentação do DNA (5) e oxidação de diferentes moléculas, levando a célula à morte. Fonte: Luz *et al.* 2011.

Existem diferentes níveis de defesa antioxidante que são capazes de eliminar as EROs ou evitar os danos causados pelo estresse oxidativo. Os antioxidantes que constituem a primeira linha de defesa celular (pois endógeno se refere ao que falamos de consumo de antioxidante em relação ao que já temos dentro do nosso corpo) e neutralizam rapidamente quaisquer radicais livres são, principalmente, as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (Figura 05). Essas enzimas convertem o radical superóxido, H_2O_2 e hidroperóxidos, respectivamente, em moléculas inofensivas (H_2O ou álcool e O_2).

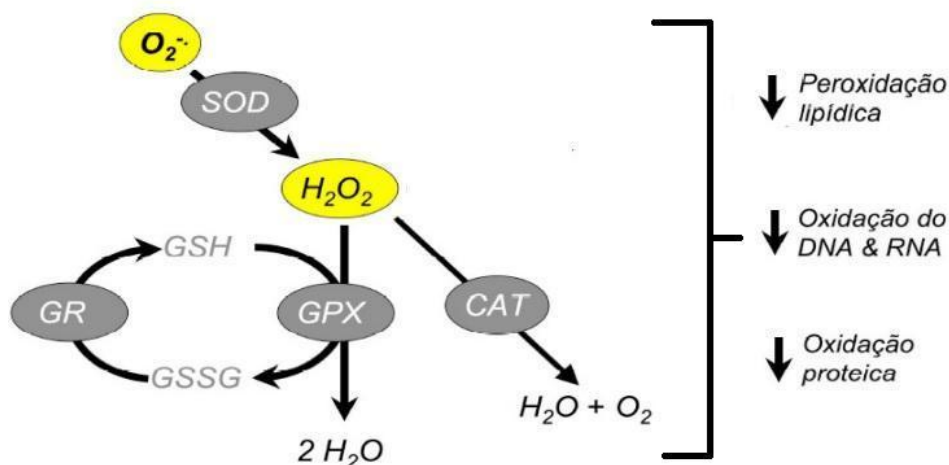


Figura 05. Mecanismos de ação das enzimas antioxidantes para controlar o estresse oxidativo. SOD: superóxido dismutase, GR: glutatona redutase, GSH e GSSG: formas reduzida e oxidada da glutatona; CAT: catalase; DNA: ácido desoxirribonucleico; RNA: ácido ribonucleico. Fonte: Luz *et al.* 2011

Além disso, existem enzimas como as glutatonas que desempenham importante papel em processos biológicos como síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular, além de atuarem como uma importante linha de defesa antioxidante. Fatores que interferem ou impedem a síntese e metabolismo das glutatonas estão associados a algumas patologias, como o câncer. As glutatonas possuem diferentes papéis dentro do mecanismo de defesa antioxidante (Barbosa *et al.*, 2010; Júnior *et al.*, 2011; Silva e Silva, 2023).

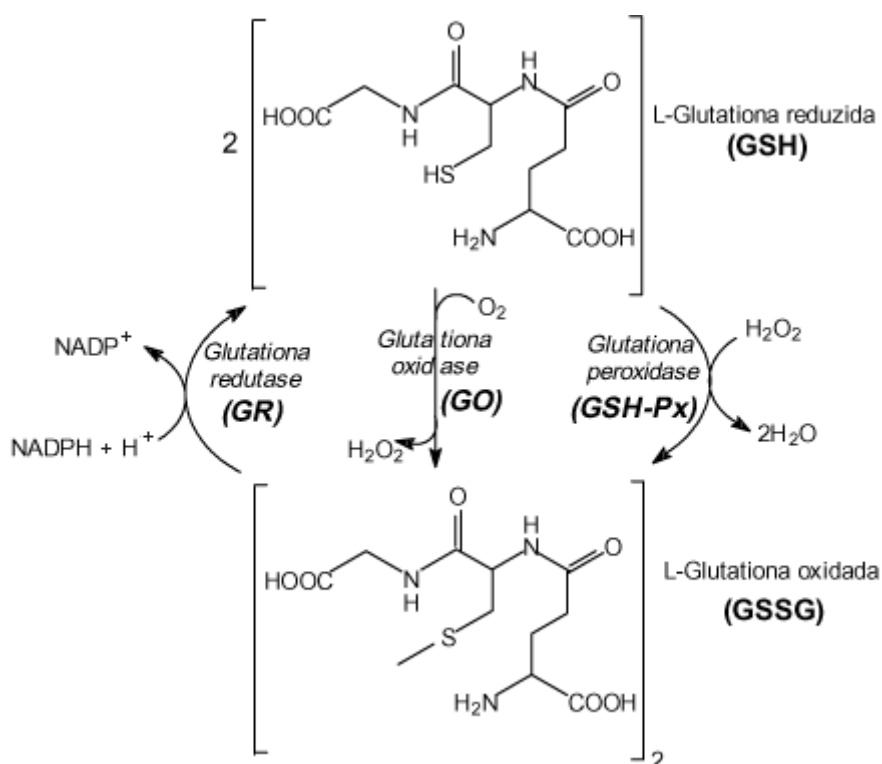


Figura 06. Interconversão de glutatona nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutatona peroxidase (GSH-Px), glutatona oxidase (GO) e glutatona redutase (GR). Fonte: Júnior *et al.*, 2001

Durante o ciclo catalítico das glutatonas (figura 06) a glutatona reduzida (GSH) é convertida em glutatona oxidada (GSSG) pela ação da glutatona oxidase (GO) ou da glutatona peroxidase (GSH-Px) na presença das moléculas de O₂ e/ou H₂O₂, respectivamente. Nessa conversão de GSH em GSSG, há a perda dos radicais tióis (-SH). Ou seja, quanto mais a célula estiver em um ambiente oxidativo, menor será a presença desses radicais tióis na enzima GSH. Em contrapartida, a glutatona redutase (GR) atua revertendo o processo descrito anteriormente, convertendo GSSG em GSH, desempenhando importante papel na manutenção do ciclo das glutatonas (Júnior *et al.*, 2001; Silva e Silva, 2023).

2.3 *Punica granatum*: constituição química e principais atividades biológicas

A *Punica granatum* L., popularmente denominada de romãzeira, pertence à família *Lythraceae*. É um arbusto ramoso que pode alcançar até 3 m de altura, com folhas simples e cartáceas. Apresenta frutos do tipo baga, globoides, que podem medir até 12 cm de diâmetro e apresentam numerosas sementes envolvidas por um arilo róseo, cheio de um líquido adocicado (Lorenzi e Matos, 2008). A romãzeira é uma fruteira oriunda do Centro do Oriente Médio, cujo cultivo se estende até os países mediterrâneos, tais como Índia e China. Uma vez disseminadas as características medicinais de seus frutos (Gálvez e Vega, 2015), a *P. granatum* tornou-se uma planta largamente utilizada na medicina popular para o tratamento de diversas desordens (Saeed et al., 2018) devido, principalmente, a sua alta atividade antioxidante (Toi, 2003; Tzulker, 2007; Naveena et al., 2008).

A Romã contém elevados níveis de polifenóis, incluindo antocianinas, flavonoides menores, punicalaginas (PU), punicalinas e outros elagitaninos (Gil et al., 2000; Seeram, Lee e Heber, 2004), além de açúcares, ácidos graxos conjugados e não conjugados, compostos aromáticos, aminoácidos, tocoferóis, esteróis, terpenoides e alcaloides (Ahmed e Yang, 2017; Saeed et al., 2018). A associação desses constituintes demonstra ser sinérgica e de potencial superior quando comparada a sua utilização de forma individual. A casca (pericarpo) da romã é a parte do fruto que apresenta maior quantidade de compostos fenólicos (Salgado et al., 2012), sendo a PU o maior e mais importante polifenol da família dos elagitaninos.

A PU é o composto responsável pela maior parte da atividade antioxidante da romã (Seeram; Heber, 2004) e já foi demonstrado ser mais potente que as vitaminas C e E (Gil, 2000), por exemplo. Além disso, foi descrito por Ramlagan et al. 2022 que a PU, composto majoritário da romã, foi capaz de reduzir o estresse oxidativo e apoptose em cardiomiócitos H9C2 (Figura 06) com toxicidade induzida por doxorrubicina (DOX), através da neutralização do aumento dos níveis de Bax e Citocromo C, além inibir a redução dos níveis de Bcl2, atuando dessa forma, como quimioprotetor cardíaco.

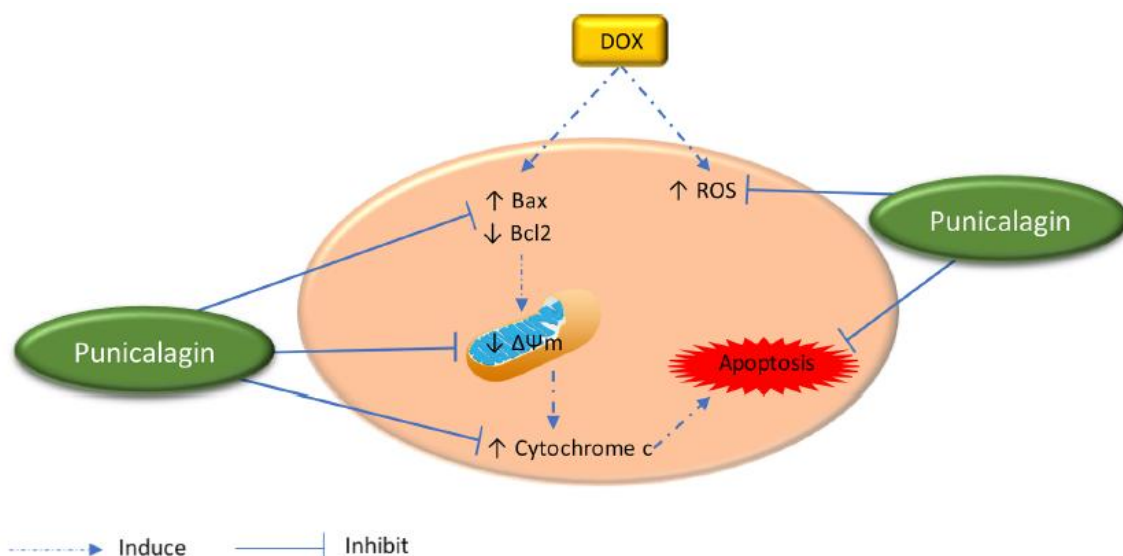


Figura 07 - Mecanismo de ação da Punicalagina (PU) contra toxicidade induzida por DOX em cardiomiócitos H9C2. Fonte: Ramlagan et al. 2022.

Além dos efeitos antioxidantes, outros estudos demonstraram que o extrato da casca de *P. granatum* apresenta efeito gastro (Ajaikumar *et al.*, 2005) e neuroprotetor; antimicrobiano (Shahidi *et al.*, 2010), antifúngico (Rongai *et al.*, 2017) e antineoplásico (Motaal *et al.*, 2011). Tais propriedades farmacológicas são atribuídas aos diferentes polifenóis citados anteriormente. Estes compostos são solúveis em água, apresentam alta taxa de absorção gastrointestinal e baixa toxicidade (Cerdá *et al.*, 2003).

Recentemente, o extrato etanólico da casca da romã foi considerado o mais rico em conteúdo de metabólitos secundários e mostrou um potencial antioxidante extremamente alto de aproximadamente 90% de inibição do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil-hidrato (DPPH). Além disso, existem evidências que apontam o potencial dos compostos ácido elágico e luteolina na supressão da proliferação e migração de células cancerosas do ovário (Liu *et al.*, 2017; Bellusci *et al.*, 2019).

2.4 *Punica granatum* e seus efeitos antioxidantes no sistema reprodutor feminino

Os efeitos antioxidantes diretos dos compostos fenólicos da romã podem ser devido a presença de grupos funcionais hidroxila (Figura 07) em torno de sua estrutura nuclear, os quais são potentes doadores de elétrons (Kulkarnia; Aradhyaa e Divakarb, 2004).

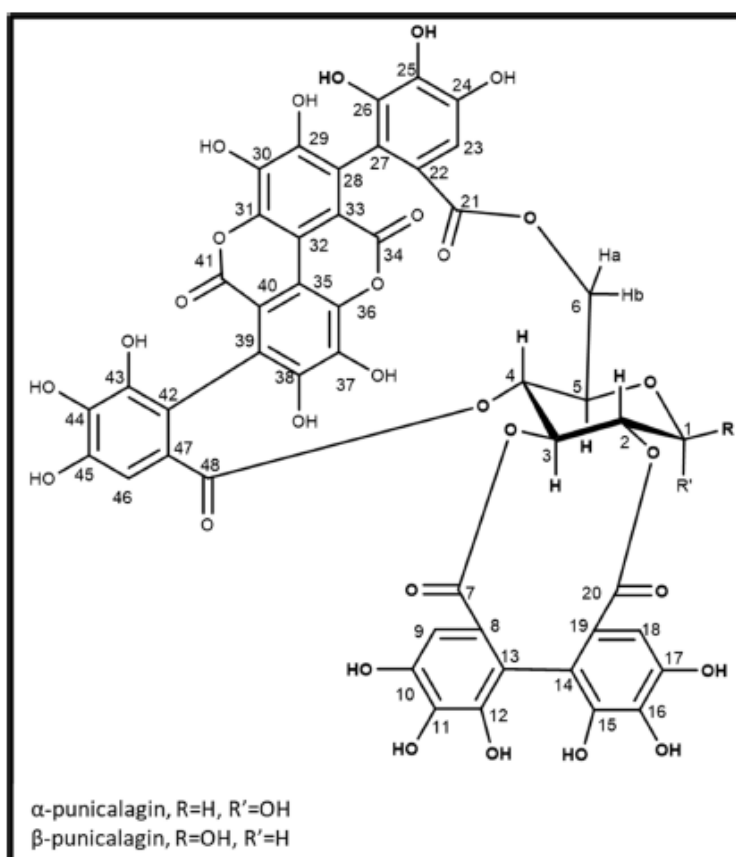


Figura 08 – Isoformas α -e β - da punicalagina, composto majoritário da Romã, e os grupamentos hidroxila ao redor da molécula. Fonte: Ramlagan *et al.* 2022.

Recentes estudos verificaram que o suco do fruto atenua a peroxidação lipídica através da diminuição dos níveis de malondialdeído (MDA), bem como aumenta a capacidade antioxidante total por estimular a atividade das enzimas antioxidantes endógenas (Ammar *et al.*, 2017; Boldaji *et al.*, 2020). Em 2013, Sun *et al.* demonstraram que o extrato da romã reduziu os níveis do ânion superóxido e aumentou a função mitocondrial, propondo que a ativação da via AMPK seria um dos mecanismos pelos quais a romã exerce sua atividade antioxidante.

Além disso, a romã foi capaz de regular os níveis dos hormônios sexuais femininos em pacientes com síndrome dos ovários policísticos (SOP) (Hosseini *et al.*, 2015; Abedini *et al.*, 2020), embora isso não tenha interferido nos níveis das gonadotrofinas. A utilização do extrato aquoso de romã aumentou a produção folicular e a quantidade de corpos lúteos em ovários de ratas wistar, indicando que essa modificação da atividade gonadal ocorreu pela interação entre o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal e a insulina sérica produzida (Bezerra, 2006).

3 JUSTIFICATIVA

A bovinocultura é uma relevante atividade económica no Brasil, colocando-o no topo do ranking dos maiores produtores mundiais de carne bovina. Contudo, o sucesso na produção de animais dessa espécie possui entraves, como os relacionados à sustentabilidade ambiental e o limitado entendimento acerca da foliculogênese. A foliculogênese é um processo complexo e seus mecanismos ainda não estão totalmente esclarecidos.

Nesse sentido, torna-se necessária a utilização do modelo animal bovino, uma vez que oportuniza o melhoramento genético de rebanhos da espécie *Bos taurus* e potencializa a produção *in vitro* de embriões desses animais. Isso possibilita com que os impactos ambientais causados pela bovinocultura sejam amenizados, sem afetar a geração de empregos e renda a nível local e internacional que essa atividade da agropecuária promove.

Dentre as ferramentas utilizadas para investigar os eventos que ocorrem durante a foliculogênese estão as biotécnicas reprodutivas, tecnologias que possibilitam o aprimoramento do crescimento e desenvolvimento folicular e da maturação oocitária. Além disso, essas biotécnicas também permitem a produção *in vitro* de embriões, realidade esta que potencializa a produção de animais de criação, bem como possibilita a medicina reprodutiva humana a transpassar as barreiras fisiopatológicas que limitam a fertilidade feminina. Porém, o próprio sistema de cultivo pode causar danos às estruturas nele cultivadas, uma vez que as condições experimentais submetem as células e tecidos reprodutivos a fatores como o excesso de luz e variações nas tensões de oxigênio atmosférico.

Com isso, moléculas de EROs, como os radicais livres, são produzidos em excesso e levam a célula a um desequilíbrio redox. Esse desequilíbrio ocorre quando a quantidade de EROs é superior ao que o mecanismo de defesa antioxidante consegue combater. Isso faz com as células sofram danos causados pelo estresse oxidativo em estruturas intracelulares importantes, como o DNA, no núcleo celular e até nos lipídeos presentes na membrana plasmática, interferindo em processos essenciais como a síntese de proteínas envolvidas em vias de diferenciação e crescimento celular.

Frente a isso, é necessário que haja o aperfeiçoamento do sistema de cultivo *in vitro* de células e tecidos reprodutivos. Dentre os estudos desenvolvidos, muitos utilizam extratos produzidos a partir de plantas por seu fácil acesso e baixo custo, uma vez que se utiliza partes do vegetal que não são aproveitados pela indústria alimentícia, como a casca do fruto. Apesar de ser um processo mais barato, este também possui alguns desafios a serem enfrentados, como as variações na composição química desses extratos a depender da parte da planta que é utilizada, seu local de cultivo e as condições ambientais da região. Nesse contexto, se destaca a romã (*Punica granatum* L.), fruteira já bem difundida pela medicina tradicional, pela utilização de chás e remédios naturais a base de romã contra patologias

em diversos sistemas fisiológicos, porém pouco investigada em relação ao sistema reprodutor feminino.

Os extratos produzidos a partir de diversas partes do fruto, principalmente da casca, apresentam elevadas concentrações de polifenóis, como a Punicalagina, que é um dos principais responsáveis pela potente atividade antioxidante exercida por esta espécie de planta. Assim, investigar o potencial efeito antioxidante exercido pela *Punica granatum* L. sobre o tecido ovariano bovino cultivado *in vitro* torna-se relevante, uma vez que as substâncias presentes no extrato produzidos a partir da casca do fruto desta espécie são fortes candidatos a serem utilizados como suplementos no cultivo *in vitro* de células e tecidos reprodutivos.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

O extrato etanólico da casca do fruto da romã (*Punica granatum* L.) tem efeito antioxidante sobre o tecido ovariano bovino cultivado *in vitro*, tornando mais eficiente o crescimento e desenvolvimento de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano através da manutenção do balanço redox pela ativação de diferentes sistemas de defesa antioxidantes como a superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e pela manutenção do ciclo catalítico da via das glutathionas .

5 OBJETIVOS

5.1 Geral

Investigar o potencial antioxidante do extrato etanólico produzido a partir da casca do fruto da romã (*Punica granatum* L.) sobre o tecido ovariano bovino cultivado *in vitro*.

5.2 Específicos

- Definir a composição química e a capacidade antioxidante total do extrato etanólico da casca do fruto da romã (EE-cPG);
- Investigar o efeito do EE-cPG sobre a morfologia, o desenvolvimento e a ultraestrutura de folículos pré-antrais bovinos inclusos em tecido ovariano bovino cultivado *in vitro*;
- Analisar o perfil redox no tecido ovariano através da mensuração dos níveis de tióis reduzidos;
- Avaliar o perfil pró-oxidante no tecido ovariano através da mensuração dos níveis de malondialdeído (MDA);
- Verificar o efeito do extrato etanólico da casca do fruto da romã sobre a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em tecido ovariano bovino cultivado *in vitro*;

CAPÍTULO 1

Extrato etanólico da casca da romã (*Punica granatum* L.) evita estresse oxidativo e preserva a morfologia de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano bovino cultivado *in vitro*

Extrato etanólico da casca da romã (*Punica granatum* L.) evita estresse oxidativo e preserva a morfologia de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano bovino cultivado *in vitro*

Maria Alice Felipe Oliveira¹, Solano Dantas Martins¹, Ernando Igo Teixeira de Assis², Jonathan Elias Rodrigues Martins³, Francisco das Chagas Costa², Queli Cristina Fidelis⁴, Sônia Nair Baó⁵, José Roberto Viana Silva², Vânia Marilande Ceccatto³, Valdevane Rocha Araújo^{*,1,6}

¹Graduate Program in Biotechnology (PPGB), Federal University of Ceará (UFC), 100, Comandante Maurocílio Rocha Ponte Avenue, postal code 62.041-040, Sobral, CE, Brazil.

²Laboratory of Biotechnology and Physiology of Reproduction -LABIREP - Biotechnology Nucleus of Sobral – NUBIS, Federal University of Ceara, Sobral, CE, Brazil.

³Laboratory of Biochemistry and Gene Expression (LABIEX), Higher Institute of Biomedical Sciences (ISCB), State University of Ceará, Fortaleza, Ce, Brazil.

⁴Laboratory of Natural Products Chemistry, Federal University of Maranhão, São Luiz, MA, Brazil.

⁵Microscopy and Microanalysis Laboratory, Department of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília, Brazil.

⁶Undergraduate course in Biological Sciences, Parnaíba Delta Federal University (UFDPAr), 2819, São Sebastião Avenue, postal code: 64.202-020, Parnaíba, PI, Brazil.

*Correspondence address:

Curso de Ciências Biológicas (CCBio)

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

Email address: valdevane.araujo@gmail.com

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi investigar o potencial antioxidante do extrato etanólico produzido a partir da casca do fruto da romã (*Punica granatum* L.) sobre o tecido ovariano bovino cultivado *in vitro*. Para a produção do extrato, frutas frescas e oriundas de mercado local foram coletadas e as cascas foram retiradas do fruto e submersas em etanol (PA 99,8%) por 5 dias. Finalmente, o extrato obtido foi liofilizado, diluído em água ultrapura e armazenado a -20°C. Uma alíquota do extrato foi utilizada para avaliação da capacidade antioxidante total (DPPH e ABTS), bem como da composição química através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de Ultravioleta-Visível (CLAE-UV-Vis). Para o experimento do cultivo, os ovários (n=24) de vacas sem raça definida foram coletados e, no laboratório, os córtex ovarianos foram fragmentados e posteriormente cultivados por 6 dias em meio

α MEM adicionado de ITS, BSA, Glutamina e Hipoxantina (α MEM⁺), na ausência (controle cultivado) ou presença de diferentes concentrações (10, 50, e 100 μ g/mL) do extrato etanólico da casca de *Punica granatum* L. (EE-cPG). O cultivo foi realizado em incubadora a 38,5 °C e atmosfera umidificada a 5% de CO₂. Após 5 dias, os fragmentos foram destinados às análises morfológicas (histologia clássica e ultraestrutura) e análises bioquímicas (atividade das enzimas SOD e CAT, conteúdo de tióis reduzidos (GSH) e quantificação dos níveis de malondialdeído). Foi utilizada a análise de variância (ANOVA), com *post-hoc* de Tukey ou Mann-Whitney, respeitando o teste de normalidade. O valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Como resultados, encontrou-se a presença da α -punicalagina no extrato etanólico produzido. Além disso, 50 e 100 μ g/mL de EE-cPG apresentaram capacidade antioxidante total significativamente superior ao longo do cultivo (D2 e D6) quando comparado ao tratamento com 10 μ g/mL de EE-cPG. Essas mesmas concentrações foram capazes de diminuir os níveis de MDA e aumentar os níveis de Tiol. Contudo, somente a concentração de 100 μ g/mL foi capaz de manter o percentual de folículos morfolologicamente normais semelhante aos controles fresco e cultivado, além de promover ativação e preservar a integridade ultraestrutural. Portanto, o extrato etanólico da casca do fruto da romã foi capaz de preservar a morfologia e a ultraestrutura de folículos pré-antrais bovinos, além de manter o equilíbrio redox, sendo 100 μ g/mL a concentração mais indicada para experimentos *in vitro*.

Palavras-chaves: Cultivo *in situ*; antioxidantes; Punicalagina.

1. Introdução

A foliculogênese em mamíferos é um processo fisiológico complexo e os mecanismos responsáveis pela sua regulação ainda não estão totalmente compreendidos. A partir disso, diversas pesquisas utilizam as biotécnicas reprodutivas que possibilitam que ocorra, *in vitro*, o crescimento e desenvolvimento de folículos e oócitos e até mesmo a produção de embriões. Dessa forma, as biotécnicas permitem que os mecanismos que permeiam a foliculogênese sejam investigados. Além disso, o desenvolvimento dessas técnicas é de grande relevância para a área da saúde humana reprodutiva e para a área da produção animal, uma vez que elas potencializam a capacidade reprodutiva das fêmeas (Luz *et al.*, 2011). Porém, tais folículos e gametas podem sofrer danos com o estresse oxidativo induzido pelas próprias condições do cultivo *in vitro*, como a variação de temperatura e oxigênio, além da exposição excessiva à luz (Silva e Silva, 2023).

O estresse oxidativo faz com que as células sofram com os danos causados pelo desbalanço redox que ocorre devido ao desequilíbrio entre a produção dos radicais livres e o combate destes pelos

mecanismos de defesas antioxidantes endógenos, desempenhado por enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (SOD) e as glutatonas. Como consequência disso, ocorre a oxidação de importantes estruturas celulares como as proteínas, os lipídeos e o DNA (Barbosa *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2022).

Por tais motivos, estudos vêm sendo desenvolvidos para investigar substâncias que sejam adicionadas ao meio de cultivo e que possam amenizar os efeitos deletérios causados pelo estresse oxidativo decorrente das condições de cultivo *in vitro* (Silva *et al.*, 2024). Nesse contexto, as plantas e seus extratos têm sido alvos constantes de investigação científica. Dentre estas, pode-se destacar a romã (*Punica granatum* L.), conhecida pela medicina tradicional, porém pouco estudada dentro do contexto das biotécnicas de reprodução.

Dentre os compostos encontrados na romã, a Punicalagina (PU) e o Ácido Elágico (AE) estão presentes em maior quantidade no fruto e são responsáveis pela maioria dos benefícios atribuídos a romã, como atividade antioxidante e antitumoral, em diferentes tecidos já estudados (Seeram *et al.*, 2005; Wenyan Sun., 2016; Khalaf *et al.*, 2019). A associação desses constituintes demonstra ser sinérgica e de potencial medicinal superior quando comparada a sua utilização de forma individual (Ahmed e Yang, 2017; Saeed *et al.*, 2018).

Em estudos anteriores, foi relatado o potencial efeito inibitório do ácido elágico na proliferação e migração de células cancerosas do ovário. Dessa forma, de acordo com os achados, este composto, presente em grande quantidade na romã, possivelmente atua regulando vias celulares de crescimento e apoptose (Liu *et al.*, 2017; Bellusci *et al.*, 2019).

É provável que os efeitos antioxidantes dos compostos fenólicos da romã ocorram devido a presença de grupos funcionais hidroxila ao redor da estrutura nuclear das moléculas presentes majoritariamente (Punicalagina e ácido elágico), os quais são potentes doadores de elétrons (Kulkarnia; Aradhyaa e Divakarb, 2004). Dentre os estudos com sistema reprodutor feminino, as soluções produzidas a partir da casca ou da semente dos frutos de *Punica granatum*, apresentam, dentre outros efeitos, principalmente o antioxidante. Yayla *et al.* (2018) verificaram que o óleo da semente de romã regula o ciclo estral e a foliculogênese ovariana, reduz o estresse oxidativo e a atividade da NADPH oxidase, além dos níveis de TNF- α , promovendo um aumento na atividade antioxidante em tecido ovariano murino submetido a isquemia e reperfusão.

A utilização do extrato da romã melhorou o desenvolvimento folicular e a quantidade de corpos lúteos em ovários de ratas *Wistar*, indicando que essa modificação da atividade gonadal ocorreu pela interação entre o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal e a insulina sérica produzida (Bezerra, 2006). Embora já se tenham trabalhos que demonstraram os efeitos antioxidantes da romã, são escassos os estudos que avaliam os efeitos dessa planta em vias antioxidantes no tecido ovariano bovino cultivado *in vitro*. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo investigar o possível efeito antioxidante

que o extrato etanólico da casca do fruto de *Punica granatum* pode exercer sobre o tecido ovariano bovino cultivado *in vitro*.

2. Material e Métodos

2.1 Químicos e aspectos éticos

Os meios de cultura e outros produtos químicos utilizados no presente estudo foram comprados da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, EUA). O presente estudo foi submetido e aprovado junto ao Comitê de Ética em Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Ceará (UECE) sob protocolo nº 09326942/2021.

2.2 Produção do extrato etanólico da casca do fruto de *Punica granatum* L. e análises químicas

A casca do fruto da *Punica granatum* L. foi retirada de frutas frescas e maduras, oriundas de cultivo comercial, e levadas ao Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN) da Universidade Estadual do Ceará. As cascas foram retiradas do fruto e submersas em etanol (PA 99,8%) por 5 dias. Após isso, o líquido, resultado da extração dos componentes da casca, foi direcionado a um rotaevaporador a 50 °C, onde o solvente foi evaporado totalmente e somente o superconcentrado do extrato foi retirado para posteriores análises (Nascimento *et al.*, 2018). Por fim, esse extrato foi liofilizado e conservado em temperatura igual ou inferior a 10°C e o pó foi diluído em água ultrapura para ser posteriormente utilizado nos experimentos nas concentrações de 10, 50 e 100 µg/mL (Seeram *et al.*, 2005).

2.3 Avaliação da capacidade antioxidante total pelo método do DPPH

O ensaio antioxidante pela captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e a curva-padrão foram realizados segundo Rufino *et al.*, (2007b), com adaptações. O preparado do reagente e mistura reacional aconteceram em ambiente escuro. Alíquota de 10, 20, 40 e 80 µL de cada solução estoque (200 µg/mL) foram adicionadas a 1990, 1980, 1960 e 1920 µL de solução metanólica de DPPH 0,06 mM, respectivamente, em tubos de ensaio distintos. As concentrações finais do extrato foram 1, 2, 4 e 8 µg/mL, respectivamente. Todas as amostras foram feitas em triplicata e repetida nas mesmas condições. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro de UV, no comprimento de onda de 517 nm, a cada minuto, até alcançar a estabilização do valor de absorbância. Metanol foi usado como branco, para calibrar o espectrofotômetro e um controle positivo foi realizado, utilizando ácido ascórbico. Os resultados das absorbâncias foram convertidos em percentual de inibição e expressos em $CE_{50} = \mu\text{g/mL}$ de DPPH a regressão calculada individualmente para cada amostra junto a amostra de diclorometano com $R=0,999$ e equação da reta $Y=0,7263x-0,87$.

2.4 Avaliação da capacidade antioxidante total pelo método do ABTS

O ensaio antioxidante pela captura do radical ABTS, 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina- 6-ácido sulfônico), foi realizado de acordo com a metodologia de Rufino *et al.*, (2007a) com adaptações. Aliquotas de 15, 30 e 60 µL de solução estoque (200 µg/mL) do extrato foram transferidas para tubos de ensaios contendo 3 mL de solução de radical ABTS previamente preparada, obtendo-se uma concentração final de 1, 2 e 4 µg/mL de extrato. Após seis minutos de agitação as amostras foram submetidas a leitura em espectrofotômetro na região do ultravioleta a 734 nm. na qual foi necessário converter os resultados em percentual de inibição da atividade antioxidante que foi expressa em CE₅₀ = µg/mL. Todas as análises foram feitas em triplicata e repetidas a triplicata. Foi feito uma curva para cada análise com R ± 0,995.

2.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-UV-Vis)

As análises cromatográficas foram realizadas no Laboratório de Produtos Naturais do Centro de Ciência e Tecnologia (CCET) / Departamento de Química da Universidade Federal do Maranhão. A amostra foi dissolvida em metanol grau espectroscópico para obter uma concentração de 2 ou 3 mg/mL. Posteriormente, 20 µL de cada amostra foi injetada em sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-UV-Vis) da marca Shimadzu com detector de UV-Vis, com uma coluna Luna C₁₈ (150 x 4,8 mm x 5µ) e usando o comprimento de onda de 254 nm. A fase móvel composta de solvente A (água/ácido acético - 98:2) e solvente B metanol, com um gradiente de eluição de: 0,1-10 minutos, 10% de B; 10-15 minutos, 50% de B; 15-20 minutos, 70% de B; 20 -30 minutos, 80% de B; 30-40 minutos, 50% de B; 40 minutos, 5% de B.

2.6 Fonte dos ovários e cultivo *in vitro* de tecido ovariano

Ovários (n=24) de vacas adultas e sem padrão racial definido foram coletados em abatedouro local e transportados ao laboratório em até 2 horas em salina fisiológica (NaCl a 0,9%) adicionada de penicilina (100 µg/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) à 4°C. Cada par de ovários foi dividido em fragmentos de 3x3x1 mm, sendo colocados, aleatoriamente, em placa de 24 poços com 500 µL (2 fragmentos/poço) de meio base α-MEM (ref. M1142 Vitrocell embriolife) suplementado com ITS (10 µg/mL de insulina, 5,5 µg/mL de transferrina e 5 ng/mL de selênio; I3146 Sigma-Aldrich), 2 mM de hipoxantina (H9636 Sigma-Aldrich), 2 mM de glutamina e 1,25 mg/mL de Albumina Sérica Bovina (BSA; A9647 Sigma-Aldrich), previamente incubado por, no mínimo, 2 horas.

As culturas foram realizadas por 6 dias a 38.5°C em atmosfera umidificada a 5% de CO₂, com diferentes concentrações (10; 50 e 100 µg/ml) do extrato da casca do fruto de *Punica granatum*. Foram realizadas trocas parciais do meio de cultura a cada 48h. Ao final do período de cultivo, os tecidos foram fixados ou congelados para realização das análises histológicas e moleculares,

respectivamente (Jimenez *et al*, 2016; Silva *et al*, 2024).

2.7 Análise morfológica e desenvolvimento folicular *in vitro* por histologia

Imediatamente após a coleta dos ovários (D0), bem como após o término do período de cultivo (D6), fragmentos ovarianos de cada tratamento foram fixados em paraformaldeído por 12 h à 4°C e destinados às análises histológicas. Para tanto, foi realizada a desidratação dos fragmentos em concentrações crescentes de etanol, diafanização em xilol e inclusão em parafina histológica. Os blocos foram seccionados seriadamente à espessura de 7 µm. Cada 5ª secção foi colocada em lâminas e coradas pelo método de hematoxilina-eosina (HE). As lâminas foram identificadas por códigos anônimos para evitar análise subjetiva e foram examinadas em microscópio (Nikon, Eclipse TS 100, Japão) com ampliação de 100 e 400x. Somente foram analisados os folículos pré-antrais cujos oócitos apresentaram o núcleo evidente na secção observada.

A avaliação da ativação e crescimento folicular foi realizada pela quantificação dos folículos nas diferentes classes foliculares de desenvolvimento: primordiais (oócito central rodeado por uma camada de células da pré-granulosa achatadas); folículos primários (oócito central rodeado por uma camada completa de células da granulosa cuboidais), e folículos secundários (oócito central com duas ou mais camadas de células da granulosa cuboidais). Esses folículos foram também classificados como folículos morfolologicamente normais quando apresentaram um oócito intacto, células da granulosa organizadas e sem núcleo picnótico ou folículos morfolologicamente degenerados quando apresentarem oócito retraído, núcleo picnótico e/ou circundado por células da granulosa, desorganizadas e destacadas da membrana basal (HULSHOF *et al.*, 1994). Os percentuais de folículos primordiais e em desenvolvimento morfolologicamente normais e degenerados foram calculados antes e após o cultivo em cada um dos tratamentos.

2.8 Análise da matriz extracelular (MEC) em tecido ovariano

Para avaliar as fibras colágenas da matriz extracelular do córtex ovariano foi realizada a coloração com Picrosirius Red (Kit Abcam) seguindo a metodologia descrita por Rittié (2017), com modificações. Resumidamente, seções ovarianas de 7 µm foram desparafinadas em xilol e incubadas em solução de Sirius Red (0,1%) por 1 h, em temperatura ambiente. Em seguida, o excesso de corante foi removido com solução de ácido acético (0,5%) e as secções, então, desidratadas e submetidas à montagem de lâmina. As imagens foram obtidas com diferenças nas cores de polarização, sendo as fibras de colágeno do tipo I (birrefringência corada em amarelo/laranja) e III (birrefringência corada em verde) (Junqueira *et al.*, 1978), utilizando microscopia de luz polarizada em microscópio Nikon E200 com câmera acoplada (Nikon, Coolpix 4500) e magnificação de 400×. Uma média de 50 cortes foram avaliados por tratamento. As imagens foram analisadas utilizando a

medição do limiar RGB para obter as porcentagens das cores, expressas em pixels, utilizando o software ImageJ.

2.9 Análise da integridade ultraestrutural das membranas e organelas de folículos cultivados inclusos no tecido ovariano

A análise da ultraestrutura folicular foi realizada com o auxílio de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para isto, pequenos fragmentos de tecido ovariano frescos (D0) ou cultivados (D6) foram fixados em solução de Karnovisk (2% de paraformaldeído, 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio, pH 7,2). Após fixação, os fragmentos foram pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1%, ferrocianeto de potássio a 0,8% e CaCl_2 a 5 mM em tampão cacodilato de sódio. Em seguida, as amostras foram desidratadas em acetona e embebidas em resina Spurr. Os cortes ultrafinos (60 nm) foram preparados quando o núcleo do oócito foi observado no corte semifino (3 μm). Os cortes semifinos foram corados com azul de toluidina e avaliados em microscopia óptica, enquanto que os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados ao microscópio eletrônico de transmissão. A avaliação ultraestrutural foi aplicada para observação dos seguintes parâmetros: integridade das membranas basal e nuclear, morfologia e densidade das organelas citoplasmáticas do oócito e das células da granulosa, bem como o grau de vacuolização citoplasmática (FAIR *et al.*, 1997).

2.10 Perfil redox (Tiol), pró (TBARS) e antioxidante (SOD e CAT) das células de tecido ovariano bovino cultivado na presença ou ausência do extrato etanólico de Punica granatum L. (EE-cPG)

2.10.1 Proteínas totais (método de Bradford)

Os fragmentos ovarianos (100 mg) foram homogeneizados com tampão fosfato de potássio (KH_2PO_4 e K_2HPO_4 ; P9791 e P3786; Sigma-Aldrich; 1:9), pH 7,5. Os homogenatos de ovário foram centrifugados a 1500g, por 10 min, a 4°C, e o sobrenadante coletado para uso nos ensaios espectrofotométricos, descritos abaixo, usando cubetas de quartzo (Genesis 10s UV-vis; Thermo Scientific), conforme descrito anteriormente (Ellman 1959). Os dados foram expressos como média s.e.m. unidade de enzima por miligrama de proteína (U/mg de proteína).

A concentração de proteínas foi determinada usando o método Bradford (Bradford 1976). Este método utiliza azul de Coomassie (Início rápido/Bradford; 500-0205; Bio-Rad) para determinar a concentração total de proteínas em cada amostra. Quando entra em contato com as proteínas, o corante forma um complexo de coloração azul, cuja absorbância está diretamente relacionada à concentração de proteína da amostra. A concentração total de proteína foi avaliada através de espectrofotometria em comprimento de onda de 595 nm, sendo determinada através de uma curva

padrão utilizando albumina (0, 2,5, 5, 10, 15, 25, 35 e 50 mg/mL). A curva de albumina foi utilizada para padronizar os níveis dos conteúdos pró e antioxidantes Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (SOD, CAT e GPx), conforme descritos abaixo.

2.10.2 Avaliação do perfil redox com base no teor de tiol

O conteúdo total de tiol foi determinado utilizando o Ácido 5,5'-ditio (2-nitrobenzoico) (DTNB; D8130; Sigma) como um índice de tiol reduzido. Resíduos de tiol reagem com DTNB (10 mM), clivando a ligação dissulfeto para formar o ânion 2-nitro-5-tiobenzoato (NTB^{2-}) em um pH neutro. NTB^{2-} é quantificado em um espectrofotômetro com comprimento de onda de 412 nm, com resultados expresso como nMol de DTNB reduzido por miligrama de proteína (Takahashi et al. 1978).

2.10.3 Determinação da produção de substâncias ácidas reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A avaliação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, avalia o produto final da peroxidação lipídica da membrana, malondialdeído (MDA), o homogenato de tecido ovariano (63 μl) foi adicionado ao (100 μl) ácido perclórico a 35%. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (5.000 rpm, 10 min, 4 °C) e realizado o aquecimento (95 °C, 30 min); ao sobrenadante (150 μl) foram adicionados o ácido tiobarbitúrico ((50 μl , a 1,2%). As leituras foram obtidas em $A_{535 \text{ nm}}$ (Cighetti *et al.*, 1999).

2.10.4 Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD será mensurada através da inibição da auto-oxidação da adrenalina (Bannister e Calabrese, 1987). A oxidação da adrenalina, na presença de catalase (CAT) em meio básico, leva a formação do radical $\cdot\text{O}_2^-$, o qual reage com a SOD, assim retardando ("inibindo") a oxidação da adrenalina. A solução de CAT (0,048 mg/mL; C9322; Sigma-Aldrich) será produzida através da adição (7:3) de tampão glicina, pH 10,2 (Dinâmica). Três volumes diferentes (10, 20 ou 40 mL) do homogenato de tecido ovariano foram então adicionados à solução e, em seguida, a adrenalina (0,218 mg/mL; E4260; Sigma-Aldrich) será adicionada para iniciar a oxidação. A oxidação será mensurada a 480 nm a cada 10 seg durante 180 seg. Os resultados foram expressos em unidades de enzimas por miligrama de proteína (U/mg de ptn).

2.10.5 Determinação da atividade da enzima catalase (CAT)

A atividade da CAT será mensurada através do consumo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como substrato a 240 nm (AEBI, 1984). A solução de H_2O_2 (152 $\mu\text{L/mL}$; PH09717RA; Êxodo científica) e tampão fosfato salina (PBS; pH 7,4) será misturada em temperatura ambiente e, então,

50 µL do homogenato de tecido ovariano foram adicionados. A cada 30 seg, o consumo de H₂O₂ será mensurado duas vezes (Aebi, 1984).

2.11 Análises estatística

Os resultados foram expressos em média das replicatas e seu correspondente erro padrão da média. A distribuição dos dados foi analisada utilizando o teste de normalidade ShapiroWilk. Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) two-way, com post-hoc de tukey, respeitando-se as hipóteses de normalidade. Os dados de classificação qualitativa foram expressos de acordo com a sua proporção, e avaliados pelo método do qui-quadrado (χ^2), através do software Graphpad Prism 7.0 (Graphpad Software, Inc., San Diego, EUA). A significância estatística será considerada quando os resultados apresentarem probabilidade de ocorrência da hipótese nula menor que 5% ($p < 0,05$).

3. Resultados

3.1 Composição química do extrato etanólico da casca do fruto da romã

O cromatograma do extrato etanólico da casca do fruto da romã apresentou vários picos entre os tempos de retenção de 6,29 a 25,97 minutos (Figura 1). O pico em 6,29 minutos apresentou tempo de retenção semelhante ao pico em 6,12 do padrão de α -punicalagina (Figura 2), o que sugere ser o anômero α -punicalagina.

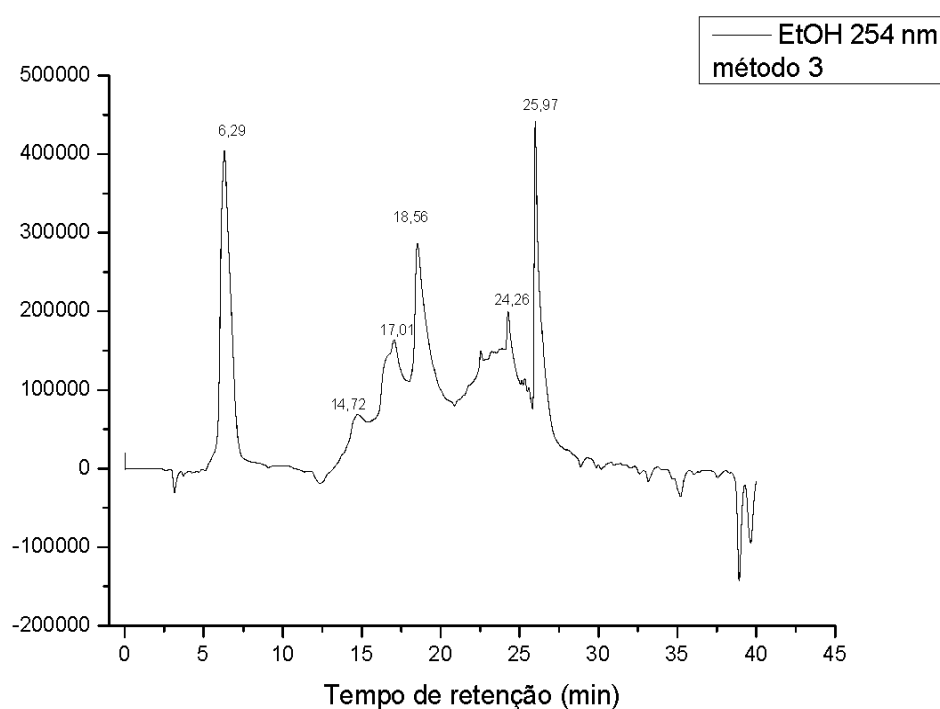


Figura 1. Cromatograma de CLAE-UV-Vis do extrato etanólico da casca de romã em 254 nm.

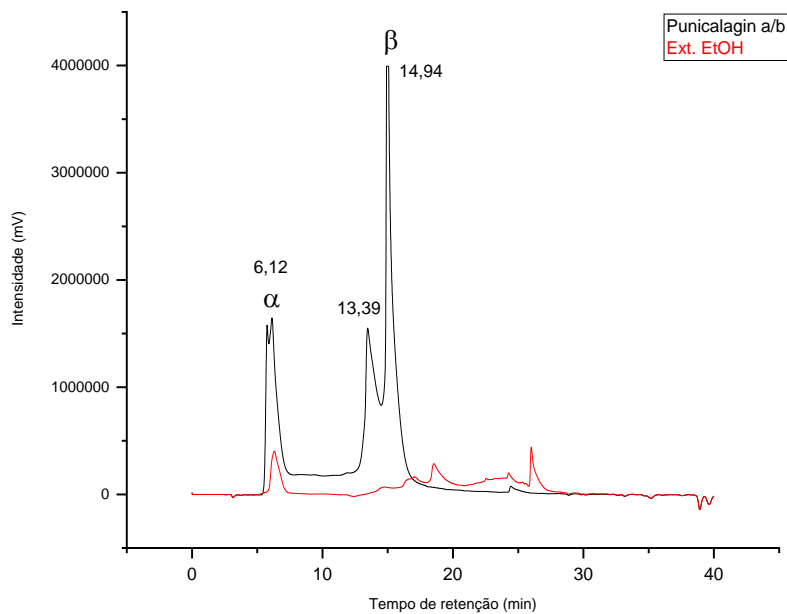


Figura 2. Sobreposição de cromatogramas de CLAE-UV-Vis do extrato etanólico (cor vermelha) e do padrão α - e β -punicalagina (cor preta), em 254 nm.

3.2 Capacidade antioxidante total do EE-cPG pelo método do DPPH e do ABTS

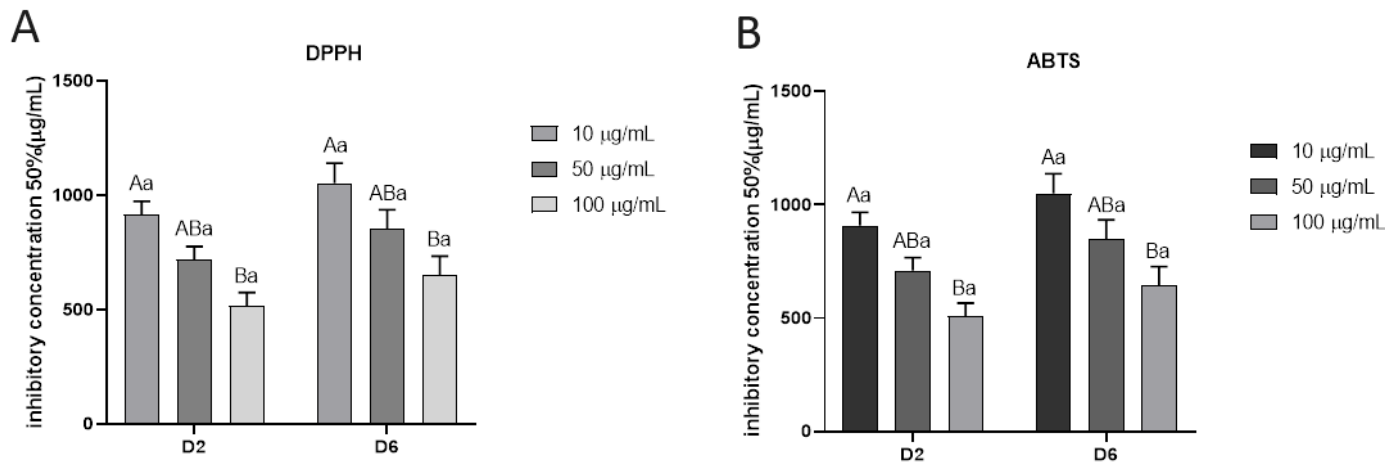


Figura 3. Capacidade antioxidante total do extrato etanólico de *Punica granatum L.* em diferentes concentrações (10, 50 e 100 µg/mL) no meio de cultivo *in vitro* em diferentes dias.

^{ABC}Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os diferentes tratamentos no mesmo dia de cultivo (P<0.05).

^{ab}Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas no mesmo tratamento em diferentes dias de cultivo (P<0.05).

A figura 3 representa a capacidade antioxidante total do extrato etanólico de *Punica granatum* no meio de cultivo nos dias 2 e 6 de cultivo que foi avaliada através da capacidade do extrato em inibir em 50% (IC₅₀) os radicais livres DPPH (A) e ABTS (B). Através desses dois métodos foi observado que, no D2 e D6 de cultivo, a concentração de 100 µg/mL apresentou maior capacidade antioxidante (P=0.0222) que a concentração de 10 µg/mL. Contudo, não houve diferença entre os dias de cultivo em uma mesma concentração (P>0.05).

3.3 Efeito do EE-cPG na atividade das enzimas antioxidante SOD e CAT

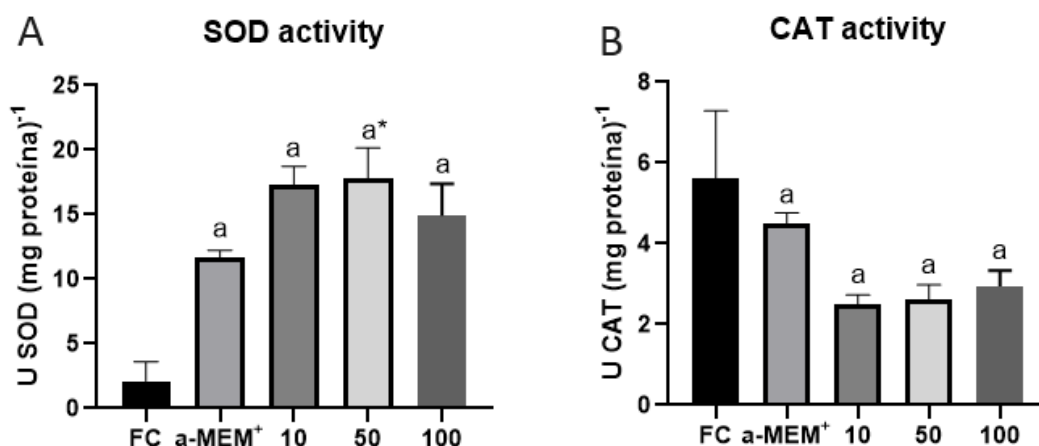


Figura 4. Atividade das enzimas superóxido dismutase (A) e catalase (B) em tecido ovariano bovino não cultivado (FC) ou cultivado na ausência (a-MEM⁺) ou na presença de diferentes concentrações do EE-cPG (10, 50 e 100 µg/mL) após 6 dias de cultivo.

^{ABC}Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os diferentes tratamentos no mesmo dia de cultivo (P<0.05).

^{ab}Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas no mesmo tratamento em diferentes dias de cultivo (P<0.05).

A figura 4 representa a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (A) e catalase (B). É possível notar que somente a concentração de 50 µg/mL apresentou maior atividade da enzima SOD quando comparada ao controle fresco. Os demais tratamentos não apresentaram diferença estatística. Já em relação a atividade da enzima CAT nenhuma diferença estatística foi observada.

3.4 Avaliação do perfil pró-oxidante com base no conteúdo de MDA

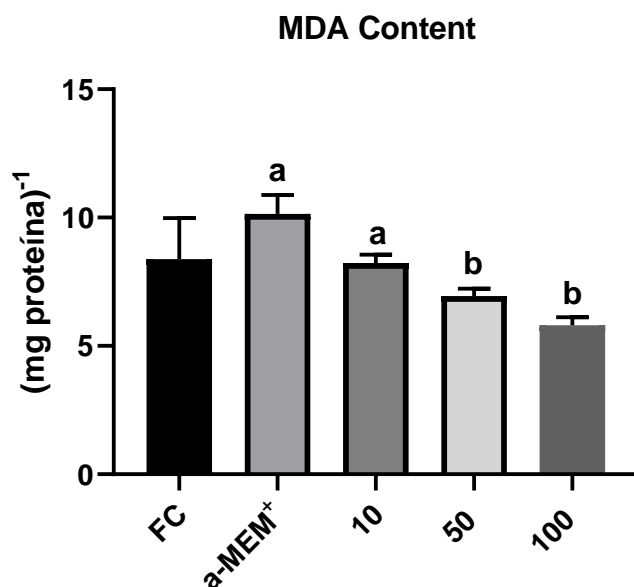


Figura 5. Conteúdo de malondialdeído em tecido ovariano bovino não cultivado (FC) ou cultivado na ausência (α -MEM⁺) ou na presença de diferentes concentrações do EE-cPG (10, 50 e 100 μ g/mL) após 6 dias de cultivo.

^{ABC}Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os diferentes tratamentos no mesmo dia de cultivo ($P < 0.05$).

^{ab}Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas no mesmo tratamento em diferentes dias de cultivo ($P < 0.05$).

Na figura 5 é possível observar o conteúdo de malondialdeído no tecido ovariano bovino cultivado por 6 dias. É notório que as concentrações de 50 μ g/mL e 100 μ g/mL mostraram capacidade de proteção ao tecido ovariano contra a peroxidação lipídica maior quando comparado a concentração de 10 μ g/mL e ao controle cultivado. Nenhum tratamento apresentou diferença significativa quando comparado ao controle fresco.

3.5 Avaliação do perfil redox com base no teor de Tiol

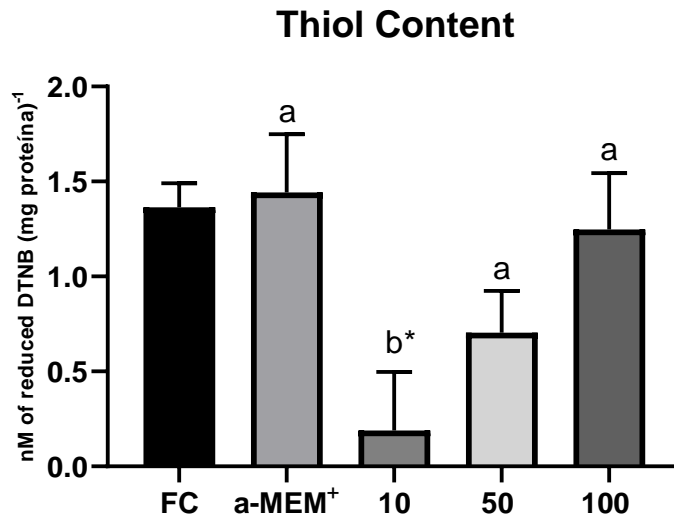


Figura 6. Conteúdo de Tiois em tecido ovariano bovino não cultivado (FC) ou cultivado na ausência (α -MEM⁺) ou na presença de diferentes concentrações do EE-cPG (10, 50 e 100 μ g/mL) após 6 dias de cultivo.

^{ABC}Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os diferentes tratamentos no mesmo dia de cultivo ($P < 0.05$).

^{ab}Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas no mesmo tratamento em diferentes dias de cultivo ($P < 0.05$).

Na Figura 6 é demonstrado os níveis de tióis no tecido ovariano. Dentre os tratamentos, a concentração de 10 μ g/mL de EE-cPG apresentou níveis reduzidos de tióis quando comparado ao controle fresco. Em contrapartida, as concentrações de 50 e 100 μ g/mL de EE-cPG foram capazes de manter os níveis de tióis semelhantes ao controle cultivado.

3.6 Efeito do EE-cPG na sobrevivência folicular

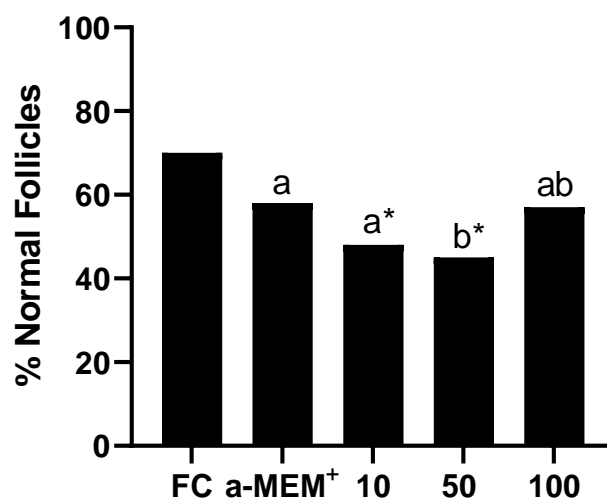


Figura 7. Percentual de folicúlos morfolologicamente normais em tecido ovariano bovino não cultivado (FC) ou cultivado na ausência (α -MEM⁺) ou na presença de diferentes concentrações do EE-cPG (10, 50 e 100 μ g/mL) após 6 dias de cultivo.

^{ABC}Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os diferentes tratamentos no mesmo dia de cultivo ($P<0.05$).

^{ab}Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas no mesmo tratamento em diferentes dias de cultivo ($P<0.05$).

Na figura 7 é possível perceber que, entre os tratamentos, somente a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ manteve o percentual de folículos normais similar aos controles fresco e cultivado. As concentrações de 10 e 50 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram percentual reduzido de folículos normais quando comparados ao controle fresco.

3.7 Efeito do EE-cPG na ativação de folículos primordiais bovinos

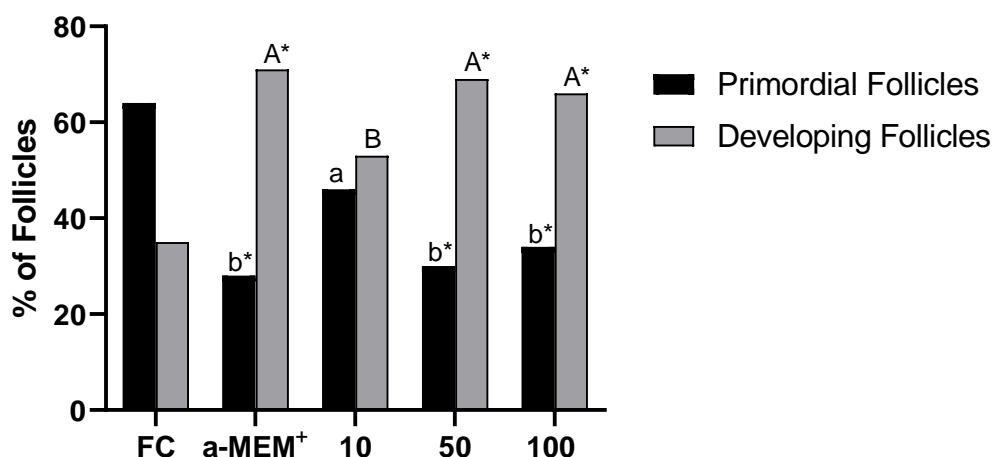


Figura 8. Percentual de folículos primordiais e em desenvolvimento em tecido ovariano não cultivado (FC) ou cultivado na ausência ($\alpha\text{-MEM}^+$) ou na presença de diferentes concentrações do EE-cPG (10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) após 6 dias de cultivo. ^{ABC}Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os diferentes tratamentos no mesmo dia de cultivo ($P<0.05$).

^{ab}Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas no mesmo tratamento em diferentes dias de cultivo ($P<0.05$).

Ao observar a figura 8, é possível perceber que as concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ foram capazes de manter os percentuais de folículos primordiais reduzidos e os percentuais de folículos em desenvolvimento aumentados em relação ao controle fresco e similares ao controle cultivado.

3.8 Efeito do EE-cPG na preservação da ultraestrutura de folículos bovinos

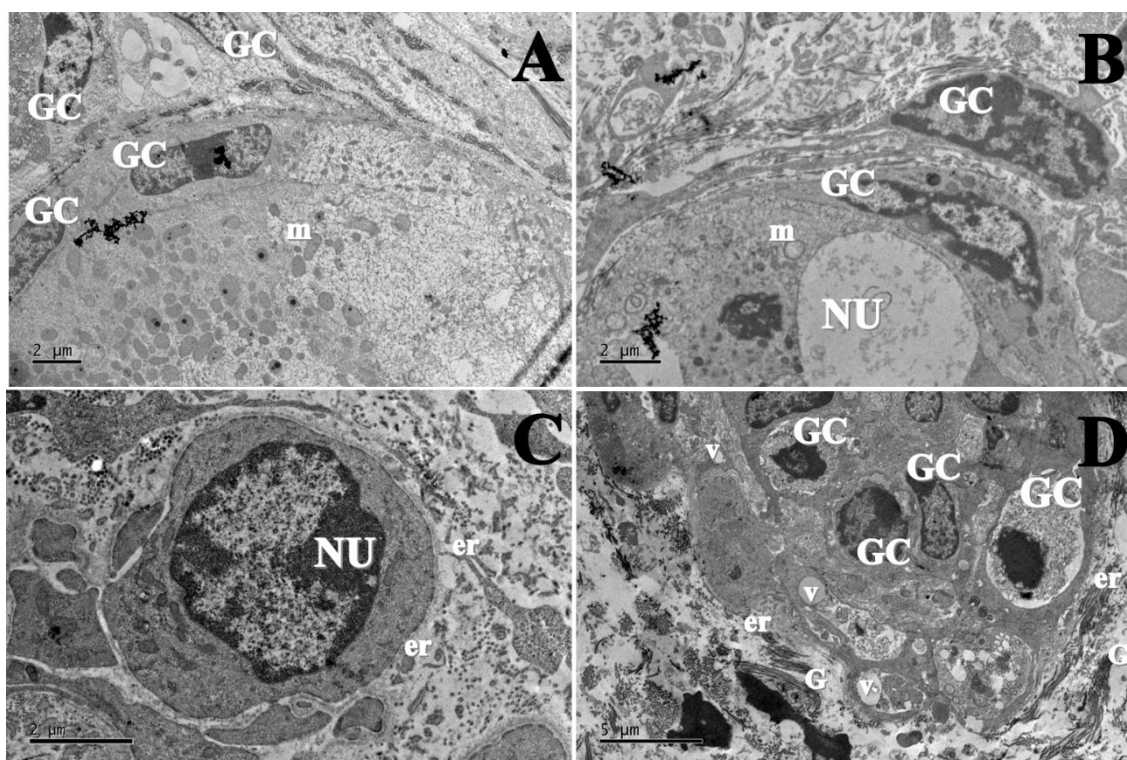


Figura 9. Eletromicrografia de tecido ovariano bovino cultivado por 6 dias. (A) Controle fresco (1500x), (B) α -MEM⁺ (1500x), (C) 10 μ g/mL de EE-cPG (1200x) e (D) 100 μ g/mL de EE-cPG GC (1000x): GC: Granulosa cell; G: Golgi complex; NU: Oocyte nucleus; m: mitochondria; er: endoplasmic reticulum; v: vesicle.

No controle cultivado (9A) é possível perceber que o citoplasma se apresenta homogêneo com numerosas mitocôndrias arredondadas, sendo tais características normalmente encontradas em folículos não cultivados. É possível notar a presença de mitocôndrias e de células da granulosa alongadas no tecido cultivado somente com α -MEM⁺, caracterizando um folículo pré-antral inicial (9B). Contudo, no tecido cultivado com 10 μ g/mL de EE-cPG (9C) é possível notar a presença de um núcleo picnótico e com retração citoplasmática, possíveis indícios de um folículo degenerado. Já no tecido cultivado com 100 μ g/mL de EE-cPG (9D) é notável a morfologia cuboide das células da granulosa, indicando que esse folículo passou pelo processo de ativação, além da presença de organelas citoplasmáticas importantes como o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi. Tais características observadas são indícios de um folículo morfologicamente normal.

3.9 Avaliação dos componentes da matriz extracelular (colágenos tipos 1 e 3)

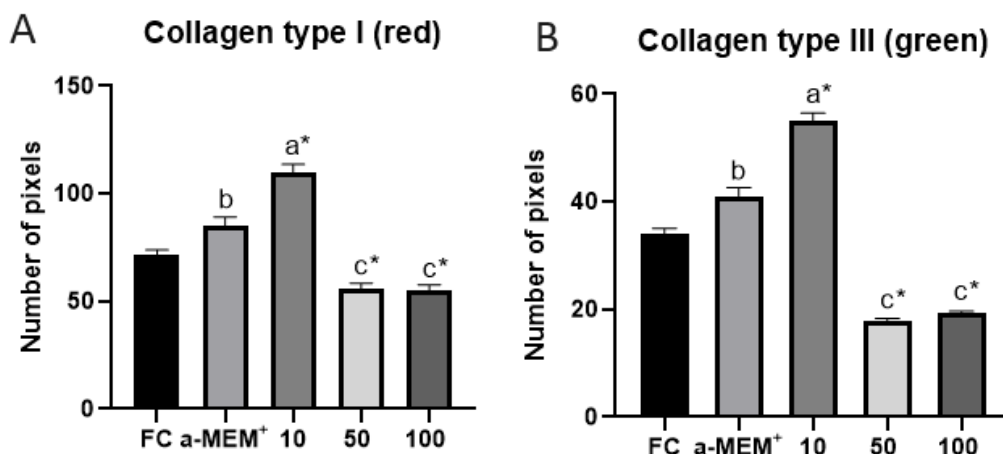


Figura 10. Fibras de colágeno em tecido ovariano não cultivado (FC) ou cultivado na ausência (α -MEM⁺) ou na presença de diferentes concentrações do EE-cPG (10, 50 e 100 μ g/mL) após 6 dias de cultivo.

^{ABC}Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os diferentes tratamentos no mesmo dia de cultivo ($P < 0.05$).

^{ab}Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas no mesmo tratamento em diferentes dias de cultivo ($P < 0.05$).

Estão representadas na Figura 10 a distribuição das fibras de colágeno do tipo 1 (Fig. 10A) e do tipo 3 (Fig. 10B) no tecido ovariano. Para ambos os tipos de fibra de colágeno (1 e 3) foi notado que as concentrações de 50 e 100 μ g/mL apresentaram quantidades reduzidas de fibras de quando comparados aos controles fresco e cultivado. Em contrapartida, a concentração de 10 μ g/mL apresentou elevadas quantidades de colágeno do tipo 1 e 3 quando comparado aos controles fresco e cultivado.

4. Discussão

Em condições de análises cromatográficas semelhantes a usada nesse estudo tem-se a eluição primeiramente do anômero α - e na sequência o β -punicalagina (Çam, Kişil, 2010; Liu *et al.*, 2022). A punicalagina é encontrada principalmente na casca do fruto da romã e é responsável por constituir cerca de 70% dos compostos totais (Barbieri, Heard, 2019). Em estudos realizados anteriormente, a punicalagina e outros compostos fenólicos foram detectados no extrato etanólico produzido a partir da casca do fruto da romã (Lu *et al.*, 2007; Talekar *et al.*, 2019)

No presente trabalho, observamos uma relação concentração-dependente relacionado a capacidade antioxidante total do EE-cPG. Possivelmente, essa capacidade em neutralizar os radicais livres é exercida pelos compostos fenólicos encontrados na romã, principalmente a punicalagina e o ácido elágico. Estas moléculas possuem ao redor de sua estrutura nuclear a presença de grupos funcionais hidroxila onde, neles, os átomos de hidrogênio atuam como potentes doadores de elétrons, exercendo, então, atividade antioxidante (Kulkarnia; Aradhyaa e Divakarb, 2004).

Em nosso estudo, o extrato etanólico da casca da romã reduziu os níveis de MDA no tecido ovariano, evitando a peroxidação lipídica e protegendo o tecido ovariano contra os possíveis danos causados pelos radicais livres. Da mesma forma, Aboonabi, Rahmat e Othaman (2016), demonstraram que o efeito antioxidante do suco da romã foi capaz de reduzir os níveis de MDA no plasma de ratos induzidos a diabetes. Além disso, o EE-cPG foi capaz de manter os níveis de tióis significativamente elevados. A enzima glutathiona reduzida (GSH), quando na presença de H_2O_2 ou O_2 , é convertida pela glutathiona peroxidase (GSH-Px) em glutathiona oxidada (GO), perdendo o grupamento tiol (-SH) de sua molécula. Portanto, a presença desse grupamento é um forte indício de que a romã evitou que o ambiente do cultivo *in vitro* se tornasse oxidativo, mantendo o equilíbrio redox celular (Júnior et al., 2001; Silva e Silva, 2023).

Uma vez que os tecidos ovarianos foram mantidos em um ambiente *in vitro* menos oxidativo, consequentemente, as defesas antioxidantes possivelmente não foram ativadas. Isso justifica o resultado observado neste trabalho em que não houve diferença estatística entre os tratamentos para a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e somente a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de ativar a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD). A SOD é responsável por converter o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), um radical livre, em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e, em seguida, a CAT atua convertendo o H_2O_2 em água. Possivelmente o EE-cPG, ao evitar a formação de radicais livres, atuou de forma a evitar o recrutamento dessa defesa antioxidantes.

Corroborando com o presente estudo, Silva *et al.* (2024) demonstraram que a adição de melatonina foi responsável por ativar a expressão de mRNA para SOD e CAT durante o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais bovinos, mas não foi observada diferença estatística entre os tratamentos para atividade antioxidante desempenhada por essas enzimas.

Ademais, a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de manter o percentual de folículos normais, promovendo ativação e desenvolvimento folicular semelhantes ao controle cultivado. De forma similar, um estudo anterior descreveu que o extrato aquoso da romã foi capaz de elevar o percentual de folículos em desenvolvimento e aumentar a quantidade de corpos lúteos no ovário de ratas jovens e adultas (Bezerra, 2006). Em concordância a estes dados, o EE-cPG também preservou a ultraestrutura dos folículos pré-antrais, mantendo a integridade de organelas citoplasmáticas essencialmente importantes para a atividade celular, como o retículo endoplasmático e o complexo de golgi, responsáveis pela síntese e armazenamento de lipídios e proteínas (Jimenez et al., 2016).

Além disso, o EE-cPG manteve os níveis de fibras de colágeno tipo 1 e 3 reduzidas. Estudos têm mostrado que a presença de fibras de colágeno no estroma cortical é um sinal característico de morte celular e cicatrização do tecido ovariano (Oktem, Oktay, 2007), portanto, nossos dados indicam que a romã é capaz de preservar a integridade tecidual.

Conclusões

Nosso estudo demonstrou que, a presença do extrato etanólico da casca da romã, especialmente na concentração de 100 µg/mL, preservou a morfologia e ultraestrutura de folículos pré-antrais, além de contribuir para a manutenção do equilíbrio redox do tecido ovariano bovino cultivado *in vitro*.

Authors' contributions

MAFO and VRA designed the study and wrote the manuscript

MAFO, SDM, EITA and FCC contributed to the experiments

JERM and MAFO performed the statistical analyses

QCF determined the chemical composition of the extract

SNB performed the ultrastructure analyzes

JRVS and VMC provided the laboratory infrastructure to carry out experiments

Declaration of competing interests

The authors have declared no conflicts of interest.

Acknowledgments

M.A.F. Oliveira received a scholarship from Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES). V.R. Araújo received a pos doctoral fellow from National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

Referências

Aboonabi A, Rahmat A, Othman F. Antioxidant effect of pomegranate against streptozotocin-nicotinamide generated oxidative stress induced diabetic rats, *Toxicology Reports*, Volume 1, 2014, Pages 915-922, ISSN 2214-7500, <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.10.022>.

Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126. doi:10.1016/S0076-6879(84)05016-3

Ahmed ST, Yang C. Effects of dietary *Punica granatum* L. by-products on performance, immunity, intestinal and fecal microbiology, and odorous gas emissions from excreta in broilers. *The Journal of Poultry Science*, v. 54, n. 2, p. 157-166, 2017.

Araújo VR, Gastal MO, Figueiredo JR, Gastal EL. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. *Reprod Biol Endocrinol*, 2014.

Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal*, v.32, p.279-312, 1987.

Barbieri M, Heard CM. Isolation of punicalagin from *Punica granatum* rind extract using mass-directed semi-preparative ESI-AP single quadrupole LC-MS, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 166, 2019, Pages 90-94, ISSN 0731-7085, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.12.033>.

Bezerra, AL. Estudo da ação de extrato de *punica granatum* sobre o metabolismo e morfologia celular de ovários e útero de ratas *Wistar*. 2006. 94 f. dissertação. (programa de pós-graduação em ciências biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

Bellusci G. et al. Kinase-independent inhibition of cyclophosphamide-induced pathways protects the ovarian reserve and prolongs fertility. *Cell death & disease*, v. 10, n. 10, p. 1-14, 2019.

Çam M, Hışıl Y. Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels, *Food Chemistry*, Volume 123, Issue 3, 2010, Pages 878-885, ISSN 0308-8146, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.011>.

Costa FC, Vasconcelos EM, Silva JRV, Souza, ALP. Influência das espécies reativas de oxigênio durante o cultivo in vitro de oócitos e folículos ovarianos de mamíferos domésticos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 46, p. 28-42, 2022.

De Assis EIT, Azevedo VAN, De Lima Neto MF, Costa FC, Paulino LRFM, Barroso, PAA, Donato MAM, Peixoto CA, Do Monte APO, Matos MHT, Godinho AN, Freire JMO, Batista ALPS, Silva JRV, Silva AWB. Protective Effect of *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt Extract on Oocyte and Follicle Toxicity Induced by Doxorubicin during In Vitro Culture of Mice Ovaries. *Animals*, v. 13, p. 18, 2023.

Fair, T. *et al.* Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles. *Molecular, Reproduction and Development*, v. 46, p.208-215, 1997.

Hulshof C.J., Figueiredo J.R., Beckers J.F., Bevers M.M. & Van Den Hurk R. 1994. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *Vet. Quart.* 16:78-80.

Jimenez CR, Araújo VR, Penitente-Filho JM, de Azevedo JL, Silveira RG, Torres CAA. The base medium affects ultrastructure and survival of bovine preantral follicles cultured in vitro, *Theriogenology*, Volume 85, Issue 6, 2016, Pages 1019-1029, ISSN 0093-691X, <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.11.007>.

Júnior LR, Hoehr NF, Vellasco AP, Kubota LT. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo, *Quim. Nova*, Vol. 24, No. 1, 112-119, 2001.

Seeram, N. P.; Lee, R.; Heber, D. Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L.) juice. *Clinica Chimica Acta*, v. 348, n. 1-2, p. 63-68, 2004.

Silva BR, Silva, JRV. Mechanisms of action of non-enzymatic antioxidants to control oxidative stress during in vitro follicle growth, oocyte maturation, and embryo development. *Animal Reproduction Science*, v. 249, p. 107186, 2023.

Liu H. et al. Main components of pomegranate, ellagic acid and luteolin, inhibit metastasis of ovarian cancer by down-regulating MMP2 and MMP9. *Cancer biology & therapy*, v. 18, n. 12, p. 990-999, 2017.

Lu J, Wei Y, Yuan Q. Preparative separation of punicalagin from pomegranate husk by high-speed countercurrent chromatography, *Journal of Chromatography B*, Volume 857, Issue 1, 2007, Pages 175-179, ISSN 1570-0232, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.06.038>.

Luz HKM, Wanderley LS, Faustino LR, Silva CMG, Figueiredo, JR, Rodrigues, APR. Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões. *Acta Scientiae Veterinariae*, 39(2): 956, 2011.

Nascimento JET *et al.* Chemical Composition and Antifungal In Vitro and In Silico, Antioxidant, and Anticholinesterase Activities of Extracts and Constituents of *Ouratea fieldingiana* (DC.) Baill, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2018, Article ID 1748487, 12 pages, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1748487>

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.551–557, 2004.

Oktem, O.; Oktay, K. Quantitative assessment of the impact of chemotherapy on ovarian follicle reserve and stromal function. *Cancer*, 2007, 110, 2222–2229.

Rittie, L. Fibrosis. *Methods in Molecular Biology*, p.520, 2017.

Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Moraes SM, Sampaio CDG, Pérez-Jiménez J.; Saura-Calixto, FD. Metodologia Científica: Determinação Da Atividade Antioxidante Total Em Frutas Pela Captura Do Radical Livre DPPH Introdução. *Comun. Tec. Embrapa* 2007a, 127, 1–4.

Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Moraes SM, Sampaio CDG, Pérez-Jiménez J.; Saura-Calixto, FD. Metodologia Científica: Determinação Da Atividade Antioxidante Total Em Frutas Pela Captura Do Radical Livre ABTS+ Introdução. *Comun. Tec. Embrapa* 2007b, 127, 1–4.

Silva BR, Costa FC, Neto MAFL, Filho FFC, De Assis EIT, Aguiar FLN, Silva AWB, Martins SD, Araujo VR, Matos MHT, Costa JJN, Silva, JRV. Melatonin acts through different mechanisms to control oxidative stress and primordial follicle activation and survival during in vitro culture of bovine ovarian tissue. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 86, 2024.

Talekar S, Patti AF, Vijayraghavan R, Arora A. Rapid, enhanced and eco-friendly recovery of punicalagin from fresh waste pomegranate peels via aqueous ball milling, *Journal of Cleaner Production*, Volume 228, 2019, Pages 1238-1247, ISSN 0959-6526, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.04.392>.

Khalaf , H. A.; Arafat , E. A.; Ghoneim, F. M. A histological, immunohistochemical and biochemical study of the effects of pomegranate peel extracts on gibberellic acid induced oxidative stress in adult rat testes. *Biotechnic & Histochemistry*, 2019. doi:10.1080/10520295.2019.1602884

Saeed M, Naveed M, Bibi J. 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(1), p.24-38, 2018.

Sun, W. et al. Pomegranate extract decreases oxidative stress and alleviates mitochondrial impairment by activating AMPK-Nrf2 in hypothalamic paraventricular nucleus of spontaneously hypertensive rats. Sci. Rep. 6, 34246; doi: 10.1038/srep34246 (2016).

Yayla M, Cetin D, Adali Y, Aksu Kilicle P, Toktay E. Potential therapeutic effect of pomegranate seed oil on ovarian ischemia/reperfusion injury in rats. Iran J Basic Med Sci 2018; 21:1262-1268. doi: 10.22038/ijbms.2018.30149.7268

7 CONCLUSÃO

Portanto, através do presente estudo, foi possível perceber que o extrato etanólico da casca do fruto de *Punica granatum* L. exerceu função antioxidante sobre o tecido ovariano bovino, através do combate aos radicais livres, evitando danos como a peroxidação de lípideos e proteínas, preservando a morfologia de folículos pré-antrais e promovendo a ativação e desenvolvimento dos mesmos. Dentre as concentrações avaliadas no cultivo *in vitro*, a de 100 µg/mL se mostrou ser uma forte candidata a ser utilizada no meio base para cultivo de tecido ovariano bovino.

8 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos na presente dissertação servem como base para a investigação e desenvolvimento de novos suplementos que sejam adicionados nos meios de cultivo para evitar o estresse oxidativo. Dessa forma, mais estudos devem ser realizados para identificar o potencial antioxidante da *Punica granatum* L. durante o cultivo de folículos isolados e durante a maturação oocitária de oócitos bovinos e de outras espécies. Além disso, testes *in vivo* poderão ser realizados para avaliar a capacidade que a *Punica granatum* L. possui em evitar os efeitos deletérios do excess das espécies reativas de oxigênio no contexto de diversas patologias.

REFERÊNCIAS

- ABEDINI, M.; GHASEMI-TEHRANI, H.; TARRAHI, M. J.; AMANI, R. The effect of concentrated pomegranate juice consumption on risk factors of cardiovascular diseases in women with polycystic ovary syndrome: a randomized controlled trial. **Phyther Res.**, v.35, p.442-451, 2020.
- AMMAR, A.; TURKI, A.; HAMMOUDA, O.; CHTOUROU, H.; TRABELSI, K. BOUAZIZ, M.; ABDELKARIM, A.; AYADI, F.; SOUISSI, N.; BAILEY, S.J. Effects of Pomegranate Juice Supplementation on Oxidative Stress Biomarkers Following Weightlifting Exercise. **Nutrients**, 2017, 9, 819; doi:10.3390/nu9080819
- AHMED, S. T.; YANG, C. Effects of dietary *Punica granatum* L. by-products on performance, immunity, intestinal and fecal microbiology, and odorous gas emissions from excreta in broilers. **The Journal of Poultry Science**, v. 54, n. 2, p. 157-166, 2017.
- ARUNAKUMARI, G., SHANMUGASUNDARAM, N., RAO, V. H. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. **Theriogenology**, v. 74, p. 884-894, 2010.
- AJAIKUMAR, K. B. et al. The inhibition of gastric mucosal injury by *Punica granatum* L.(pomegranate) methanolic extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 1-2, p. 171-176, 2005.
- AKSU, D. S. et al. The investigation of neuroprotective effects of pomegranate juice against low level lead induced oxidative stress in rats brain. **Eurasian Journal of Veterinary Sciences**, v. 32, n. 4, p. 255-259, 2016.
- ARAÚJO, V. R.; GASTAL, M. O.; FIGUEIREDO, J. R.; GASTAL, E. L. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12, p. 78, doi:10.1186/1477-7827-12-78, 2014.
- CUNHA, E.V. *et al.* Effect of bone morphogenetic proteins 2 and 4 on survival and development of bovine secondary follicles cultured in vitro *in vitro*. **Theriogenology**, v.110, p. 44 - 51, 2018.
- BAERWALD, A. R.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. **Human reproduction update**, v. 18, n. 1, p. 73-91, 2012.
- BANNISTER JV, CALABRESE L. Assays for superoxide dismutase. **Methods Biochem Anal**, v.32, p.279-312, 1987.

BARREIROS, A.B., DAVID, S. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p.113-123, 2006.

BELLUSCI, G. et al. Kinase-independent inhibition of cyclophosphamide-induced pathways protects the ovarian reserve and prolongs fertility. **Cell death & disease**, v. 10, n. 10, p. 1-14, 2019.

BEZERRA, Andreza de Lemos. **Estudo da ação de extrato de *Punica granatum* sobre o metabolismo e morfologia celular de ovários e útero de ratas wistar**. 2006. 94 f. Dissertação. (Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

BOLDAJI, R.B., AKHLAGHI, M., SAGHEB, M.M., ESMAEILINEZHAD, Z. Pomegranate juice improves cardiometabolic risk factors, biomarkers of oxidative stress and inflammation in hemodialysis patients: a randomized crossover trial. **J. Sci. Food Agric.** v.100(2), 846-854, 2020.

BERTOLDO, M.J., DUFFARD, N., BERNARD, J., FRAPSAUCE, C., CALAIS, L., RICO, C., et al. Effects of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) supplementation during culture of the sheep ovarian cortex. **Anim. Reprod. Sci.** v. 149, p.124-134, 2014.

BEZERRA, F.T.G. *et al.* Cilostamide and follicular hemisections inhibit oocyte meiosis resumption and regulate gene expression and cAMP levels in bovine cumulus-oocyte complexes. **Livestock Science**, v.184, p.112-118, 2016.

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.

CERDÁ, B. et al. Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice. **European Journal of Nutrition**, v. 42, n. 1, p. 18-28, 2003.

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

CHAN, L.P; TSENG, Y.P; LIU, C.; LIANG, C.H. Fermented pomegranate extracts protect against oxidative stress and aging of skin. **J Cosmet Dermatol**. 00:1–10, 2021.

DEL COLLADO M, et al. *In vitro* maturation impacts cumulus-oocyte complex metabolism and stress in cattle. **Reproduction**, v.154(6), p.881-893, 2017.

DE ASSIS, E. I. T. ; AZEVEDO, V. A. N. ; NETO, M. F. L; COSTA, F. C. ; PAULINO, L. R. F. M. ; BARROSO, P. A. A. ; DONATO, M. A. M. ; PEIXOTO, C. A. ; DO MONTE, A. P. O. ; MATOS, M. H. T. ; GODINHO, A. N. ; FREIRE, J. M. O. ; BATISTA, A. L. P. S. ; SILVA, J. R. V. ; SILVA, A. W. B. . Protective Effect of *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt Extract on Oocyte and Follicle Toxicity Induced by Doxorubicin during In Vitro Culture of Mice Ovaries. **Animals**, v. 13, p. 18, 2023.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. Brasil é o quarto maior produtor de grãos e o maior exportador de carne bovina do mundo, 2020. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/10180/62618376/O+AGRO+NO+BRASIL+E+NO+MUNDO.pdf>> Acesso em: 21 fev. 2024.

FABBRI R, PASQUINELLI G, MONTANARO L, MOZZANEGA B, MAGNANI V, TAMBURINI F, et al. Healthy early preantral follicle can be obtained in a culture of frozen–thawed human ovarian tissue of 32 weeks. **Ultrastruct Pathol.**; v.31(4), p.257–262, 2007.

FAIR, T. *et al.* Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles. **Molecular, Reproduction and Development**, v. 46, p.208-215, 1997.

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.

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

GÁLVEZ, M. Y. L.; VEGA, A. M. El Granado. Variedades, técnicas de cultivo y usos. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, 2015.

GOUVEIA BB, MACEDO TJS, SANTOS JMS, BARBERINO RS, MENEZES VG, MULLER MC, ALMEIDA JRGS, FIGUEIREDO JR, MATOS MHT. Supplemented base medium containing *Amburana cearensis* associated with FSH improves in vitro development of isolated goat preantral follicles. *Theriogenology*, v.86, n.5, p.1275–1284, 2016.

GUPTA, P.S.P., NANDI, S. Isolation and culture of preantral follicles for retrieving oocytes for the embryo production: present status in domestic animals. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p. 513–519, 2012.

GIL, M. I. et al. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, v. 48, n. 10, p. 4581-4589, 2000.

HOSSEIN, K. J.; LEILA, K. J.; EBRAHIM, T.; KOUKHDAN NAZANIN, S. J.; FARZAD, P. The effect of pomegranate juice extract on hormonal changes of female wistar rats caused by poly-cystic ovarian syndrome. **J. Biomed. Pharmacol.**, v.8, p.971-7. 2015.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas, 2 ed., p.350-351. São Paulo, 2008.

LUZ, H. K. M.; WANDERLEY, L. S.; FAUSTINO, L. R.; SILVA, C. M. G.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, 39(2): 956, 2011.

LIU, Huidi. et al. Main components of pomegranate, ellagic acid and luteolin, inhibit metastasis of ovarian cancer by down-regulating MMP2 and MMP9. **Cancer biology & therapy**, v. 18, n. 12, p. 990-999, 2017.

MAGALHÃES, D. M. *et al.* *In vitro* production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. **Theriogenology**, v. 75: p. 182-188, 2011.

McLAUGHLIN, M. *et al.* Activin promotes follicular integrity and oogenesis in cultured preantral bovine follicles. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, p. 644-653, 2010.

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.551–557, 2004.

MOTAAL, A. A.; SHAKER, S. Anticancer and antioxidant activities of standardized whole fruit, pulp, and peel extracts of Egyptian pomegranate. In: **The Open Conference Proceedings Journal**, v. 2, p. 41-45, 2011.

NASCIMENTO, D. R.; BARBALHO, E. C.; GONDIM BARROZO, L.; DE ASSIS, E. I. T.; COSTA, F. C.; SILVA, J. R. V.; J.R.V. SILVA. The mechanisms that control the preantral to early antral follicle transition and the strategies to have efficient culture systems to promote their growth in vitro. **Zygote**, v. 31, p. 1-11, 2023.

NAVEENA, B.; SEM, A.; VAITHIYANATHAN, S.; BABJI, Y.; KONDAIAH, N. Comparação da

eficácia do suco de romã extrato em pó de casca de romã e BHT antioxidantes em frango cozidos. **Meat Sci.**, v.80, p.1304-1308. 2008.

O'BRIEN, M.J., PENDOLA, J.K., EPPIG, J.J. A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. **Biol. Reprod.**, v.68, p.1682–1686, 2003.

RAMLAGAN, P.; LABIB, R. M.; FARAG, M. A.; NEERGHEEN, V. S. Advances towards the analysis, metabolism and health benefits of punicalagin, one of the largest ellagitannin from plants, with future perspectives. **Phytomedicine Plus**, 2022.

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

TELFER, E.E. *In vitro* growth (IVG) of human ovarian follicles. **Acta Obstet Gynecol Scand.** v.98, p.653-658, 2019.

SÁ, N.A.R., ARAÚJO, V.R., CORREIA, H.H.V., FERREIRA, A.C.A., GUERREIRO, D.D., SAMPAIO, A.M., et al. Anethole improves the *in vitro* development of isolated caprine secondary follicles. **Theriogenology**, v.89, p.226–234, 2017.

SAEED, M.; NAVEED, M.; BIBI, J.; 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(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.

SEERAM, N. P.; LEE, R.; HEBER, D. Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L.) juice. **Clinica Chimica Acta**, v. 348, n. 1-2, p. 63-68, 2004.

SILVA, J.R.V., VAN DEN HURK, R., FIGUEIREDO, J.R. [Ovarian follicle development in vitro in vitro and oocyte competence: advances and challenges for farm animals.](#) **Domestic Animal Endocrinology**, v. 55, p.123-135, 2016.

KHALAF, H. A.; ARAFAT, E. A.; GHONEIM, F. M. A histological, immunohistochemical and biochemical study of the effects of pomegranate peel extracts on gibberellic acid induced oxidative

stress in adult rat testes. **Biotechnic & Histochemistry**, 2019. doi:10.1080/10520295.2019.1602884

SHAH, J.S., SABOUNI, R., CAYTON VAUGHT K.C., OWEN, C.M., ALBERTINI, D.F., et al.
Biomechanics and mechanical signaling in the ovary: a systematic review. **J. Assist. Reprod. Genet.**
v.35, p.1135-1148, 2018.

WAIZ, S.A., RAIES-UL-HAQ, M., DHANDA, S., KUMAR, A., GOUD, T.S., CHAUHAN, M.S.,
UPADHYAY, R.C. Heat stress and antioxidant enzyme activity in bubaline (*Bubalus bubalis*)
oocytes during *in vitro* maturation. **Int. J. Biometeorol.**, v. 60(9), p.1357-1366, 2016.

WU, J., BENJAMIN, R.E., CARRELL, D.T. *In vitro* growth, maturation, fertilization, and
embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. **Biology of Reproduction**, v 64,
p. 375-381, 2001.