



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MARIA EDUARDA ALENCAR BORGES

**EFEITO DO EXTRATO DA FUMAÇA DE CIGARRO NA MORFOLOGIA E
ESTRESSE OXIDATIVO DE TECIDO OVARIANO CAPRINO CULTIVADO IN
VITRO**

MOSSORÓ

2024

MARIA EDUARDA ALENCAR BORGES

**EFEITO DO EXTRATO DA FUMAÇA DE CIGARRO NA MORFOLOGIA E
ESTRESSE OXIDATIVO DE TECIDO OVARIANO CAPRINO CULTIVADO IN
VITRO**

Monografia apresentada à Universidade
Federal Rural do Semi-Árido como requisito
para obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dra. Gerlane Modesto da
Silva

MOSSORÓ

2024

©Todos os direitos estão reservados à Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996, e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata, exceto as pesquisas que estejam vinculadas ao processo de patenteamento. Esta investigação será base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) seja devidamente citado e mencionado os seus créditos bibliográficos.

B732e Borges , Maria Eduarda Alencar .
Efeito do extrato da fumaça de cigarro na
morfologia e estresse oxidativo de tecido
ovariano caprino cultivado in vitro / Maria
Eduarda Alencar Borges . - 2024.
60 f. : il.

Orientadora: Gerlane Modesto Da Silva.
Monografia (graduação) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Curso de Biotecnologia,
2024.

1. Reserva folicular ovariana. 2. Tabagismo.
3. Infertilidade. 4. Biotecnologia reprodutiva.
5. Exposição à fumaça de cigarro. I. Silva, Gerlane
Modesto Da, orient. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade com
AACR2 e os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva
CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

MARIA EDUARDA ALENCAR BORGES

**EFEITO DO EXTRATO DA FUMAÇA DE CIGARRO NA MORFOLOGIA E
ESTRESSE OXIDATIVO DE TECIDO OVARIANO CAPRINO CULTIVADO IN
VITRO**

Monografia apresentada à Universidade
Federal Rural do Semi-Árido como requisito
para obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Defendida em: 22/10/2024

BANCA EXAMINADORA

Gerlane Modesto da Silva, Profa. Dra. (UFERSA)
Presidente

Alexsandra Fernandes Pereira, Profa. Dra. (UFERSA)
Membro Examinador

Cibele dos Santos Borges, Profa. Dra. (UFERSA)
Membro Examinador

Francisca Edineuza de Alencar Pereira (In Memoriam).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus; sua graça e misericórdia foram a luz que iluminou meu percurso.

Ao meu querido esposo Paulo Franco, que eu amo e admiro profundamente, expresso a minha sincera gratidão por estar sempre ao meu lado, celebrando as pequenas conquistas e me levantando nos momentos de fraqueza. Agradeço pelo esforço constante, pelo companheirismo e pela paciência durante toda essa jornada, que teria sido árdua sem você.

À minha mãe, Edilania Alencar, que é a minha maior inspiração. Sua incessante luta diária para que eu pudesse continuar neste curso é um testemunho do seu amor inabalável. Cada sacrifício que você fez ecoa em cada conquista minha, e cada passo que dou neste caminho é seu também. Sem você, nada disso seria possível.

À minha irmã, Beatriz Alencar, minha fiel companheira. Saber que se espelha em mim foi o que me sustentou nos momentos mais desafiadores e o que me motivou a continuar. Obrigada pelas palavras de apoio e abraços revigorantes. Eu não teria conseguido sem você.

À minha avó, Salete Alencar, por me lembrar diariamente que é a minha maior intercessora e que tem orgulho da pessoa que me tornei. Foi isso que me sustentou nos momentos em que quis desistir.

Ao meu primo, Ericles Mateus, por me apoiar e por secar as minhas lágrimas, que não foram poucas, durante todo esse trajeto. Você fez com que os anos na faculdade fossem mais leves e felizes.

À minha família, agradeço por orarem, torcerem e vibrarem comigo em cada uma das minhas conquistas.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Gerlane Modesto, uma peça fundamental para meu crescimento profissional e pessoal, expresso meu sincero agradecimento. Sou profundamente grata pela amizade e pelo apoio contínuo ao longo da minha trajetória, especialmente nos últimos meses. Seu suporte, seus conselhos e seu encorajamento foram essenciais para a conclusão deste trabalho. Agradeço de coração por ter aceitado me orientar.

Aos meus amigos Carol Lopes, Evair Matoso, Letícia Costa, Ruan Leandro e Thífany Riani, e aos meus amigos e colegas de profissão, Caio César, Emanuela Rafaelly e Wellison Martins, agradeço por cada risada compartilhada e por cada palavra de apoio. Vocês são especiais para mim.

Aos meus colegas de laboratório, Fabrícia Rodrigues, Fernanda Vitória, Isadora Pereira, Raissa Carolina, Rebeca Paulina e Victor Gabriel, que se dispuseram a me auxiliar sempre, expressei minha sincera gratidão. Obrigada por todo o apoio, palavras de estímulo e por tornarem a rotina laboratorial mais divertida. Vocês fizeram dessa reta final um período memorável.

À prof^ª. Dr^ª. Cibele dos Santos e ao prof. Dr. Marcelo Bezerra, por cederem os seus respectivos laboratórios e insumos para que fosse possível realizar o presente trabalho.

Ao prof. Dr. Emanuel Kennedy, que, além de fornecer seu laboratório e insumos, dedicou seu tempo para auxiliar no presente projeto, meu sincero agradecimento.

À banca examinadora, prof^ª. Dr^ª. Cibele dos Santos e prof^ª. Dr^ª. Alexsandra Fernandes Pereira, por dedicar tempo e expertise na avaliação deste trabalho. Suas respectivas contribuições foram fundamentais para o aprimoramento da qualidade do projeto e para o meu crescimento acadêmico.

RESUMO

Dados fornecidos pela OMS (2021) mostram que o hábito de fumar está presente na vida de 7,8% de mulheres no mundo. Embora seja consenso o prejuízo reprodutivo dos componentes do cigarro, o mecanismo pelo qual a fumaça de cigarro altera a morfologia da reserva folicular ovariana ainda é pouco compreendido. Esse estudo buscou avaliar o efeito do extrato da fumaça de cigarro na morfologia e estresse oxidativo de tecido ovariano caprino cultivado *in vitro*. Além disso, buscou-se determinar se é o estresse oxidativo o mecanismo pelo qual a fumaça de cigarro afeta os folículos. 6 ovários foram coletados em abatedouro local, onde a sua utilização está de acordo com a Legislação Brasileira para cuidado e uso de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica. O meio de base utilizado foi o α -MEM suplementado com ITS (insulina 6,25 μ g/mL, transferrina 6,25 μ g/mL e selênio 6,25 ng/mL), piruvato a 0,23 mM, glutamina a 2 mM, hipoxantina a 2 mM, e 1,25 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), sendo denominado α -MEM+. 5 Fragmentos (3x3x1 mm) do córtex ovariano foram obtidos dos ovários. Dois destes fragmentos foram imediatamente fixados em carnoy e destinados à histologia clássica (controle fresco), enquanto dos demais, um foi cultivado por 7 dias na ausência de extrato da fumaça de cigarro (α -MEM+), e os outros dois foram cultivados presença de extrato da fumaça de cigarro (EFC) em concentrações de 2,5% e 5% (EFC: 2,5% e 5%, respectivamente). Foram realizadas três repetições. O cultivo foi realizado em placas de 24 poços, contendo 1 mL de meio, em uma incubadora a 39°C e 5% de CO₂ em ar. Após a inclusão em blocos de parafina, cortes seriados à espessura de 7 μ m foram obtidos, montados em lâminas e corados pelo método do ácido periódico de Schiff. Foram realizadas análises morfológicas; análises para determinação do estresse oxidativo; análises da densidade celular do estroma e avaliação da atividade da enzima catalase. Os resultados foram expressos como média $\pm$ SEM e submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido de teste de Tukey. Os valores foram considerados significativos quando $P < 0,05$. Como resultados foi constatado uma redução significativa no percentual de folículos morfolologicamente normais após sete dias de cultivo na presença do extrato da fumaça de cigarro, independente da concentração avaliada, quando comparado ao controle fresco e o controle cultivado. No entanto, não foram observadas diferenças estatísticas na produção de EROs, atividade da catalase e densidade celular do estroma entre os tratamentos avaliados. Na categoria folicular, foi observada uma redução significativa no percentual de folículos morfolologicamente normais nos tratamentos com EFC (2,5%: 42,23% $\pm$ 9,89; 5%: 37,77% $\pm$ 7,99) quando comparado ao controle fresco (92% $\pm$ 3,99) e cultivado (85% $\pm$ 5,00) ($P < 0,05$). Contudo, os grupos cultivados não apresentaram diferenças significativas entre si. Diante disso, concluímos que o extrato da fumaça de cigarro reduz o percentual de folículos pré-antrais morfolologicamente normais após 7 dias de cultivo *in vitro*. Além disso, evidenciou-se que o estresse oxidativo não parece ser o mecanismo responsável pelas alterações observadas na morfologia folicular.

Palavras-chave: Reserva folicular ovariana; Tabagismo; Infertilidade; Biotecnologia reprodutiva; Exposição à fumaça de cigarro.

ABSTRACT

Data provided by the WHO (2021) show that smoking is a habit present in the lives of 7.8% of women worldwide. Although there is a consensus that cigarette smoke is harmful to reproduction, the mechanism by which cigarette smoke alters the morphology of the ovarian follicular reserve is still poorly understood. This study sought to evaluate the effect of cigarette smoke extract on the morphology and oxidative stress of goat ovarian tissue cultured *in vitro*. In addition, we sought to determine whether oxidative stress is the mechanism by which cigarette smoke affects follicles. Six ovaries were collected from a local slaughterhouse, where their use is in accordance with Brazilian legislation for the care and use of animals in teaching or scientific research activities. The base medium used was α -MEM supplemented with ITS (insulin 6.25 μ g/mL, transferrin 6.25 μ g/mL and selenium 6.25 ng/mL), pyruvate 0.23 mM, glutamine 2 mM, hypoxanthine 2 mM, and 1.25 mg/mL bovine serum albumin (BSA), being called α -MEM+. 5 Fragments (3x3x1 mm) of the ovarian cortex were obtained from the ovaries. Two of these fragments were immediately fixed in Carnoy and destined for classical histology (fresh control), while of the others, one was cultured for 7 days in the absence of cigarette smoke extract (α -MEM+), and the other two were cultured in the presence of cigarette smoke extract (CSE) at concentrations of 2.5% and 5% (CSE: 2.5% and 5%, respectively). Three replicates were performed. The culture was performed in 24-well plates containing 1 mL of medium in an incubator at 39°C and 5% CO₂ in air. After embedding in paraffin blocks, serial sections at a thickness of 7 μ m were obtained, mounted on slides and stained by the periodic acid-Schiff method. Morphological analyses were performed; analyses to determine oxidative stress; analyses of stromal cell density and evaluation of catalase enzyme activity. The results were expressed as mean $\pm$ SEM and submitted to analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. Values were considered significant when $P < 0.05$. As a result, a significant reduction in the percentage of morphologically normal follicles was observed after seven days of culture in the presence of cigarette smoke extract, regardless of the concentration evaluated, when compared to the fresh control and the cultured control. However, no statistical differences were observed in ROS production, catalase activity and stromal cell density between the treatments evaluated. In the follicular category, a significant reduction in the percentage of morphologically normal follicles was observed in the EFC treatments (2.5%: 42.23% $\pm$ 9.89; 5%: 37.77% $\pm$ 7.99) when compared to the fresh control (92% $\pm$ 3.99) and cultured (85% $\pm$ 5.00) ($P < 0.05$). However, the cultured groups did not show significant differences between them. Therefore, we conclude that cigarette smoke extract reduces the percentage of morphologically normal preantral follicles after 7 days of *in vitro* culture. In addition, it was shown that oxidative stress does not appear to be the mechanism responsible for the changes observed in follicular morphology.

Keywords: Ovarian follicular reserve; Smoking; Infertility; Reproductive biotechnology; Exposure to cigarette smoke.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2. Anatomia interna do ovário contendo as principais estruturas.....	18
Figura 3. Anatomia do sistema reprodutor feminino em caprinos.....	20
Figura 4. Anatomia do sistema reprodutor feminino em roedores.....	21
Figura 5. Foliculogênese ovariana.....	24
Figura 6. Cultivo in vitro bidimensional (2D) e tridimensional (3D).....	26
Figura 7. Principais sistemas de cultivo in vitro de folículos ovarianos.....	27
Figura 8. Esquema ilustrativo das reações catalisadas pelas enzimas SOD, GPX e CAT.....	32
Figura 9. Sistema para coleta do extrato aquoso da fumaça de cigarro (EFC).....	38
Figura 11. Preparação da placa de 24 poços para o cultivo in vitro dos fragmentos ovarianos durante.....	40
Figura 12. Estágios de desenvolvimento folicular.....	41

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	– Percentual de folículos morfolologicamente normais	44
Gráfico 2	– Dosagem de espécies reativas de oxigênio	45
Gráfico 3	– Percentual de folículos primordiais (a) e em crescimento (b)	46
Gráfico 4	– Densidade das células do estroma.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação entre características reprodutivas	21
Tabela 2. Atividade da catalase	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina sérica bovina
CAT	Catalase
DMSO	Dimetilsulfóxido
EFC	Extrato da fumaça de cigarro
EROS	Espécies Reativas de oxigênio
EFC	Extrato da fumaça de cigarro
KOH	Hidróxido de Potássio
NBT	Sal azul de nitrotetrazólio
PBS	Solução salina tamponada com fosfato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Sistema reprodutor feminino em humanos, caprinos e roedores.....	17
2.2 Foliculogênese.....	22
2.3 Cultivo in vitro de tecido ovariano.....	25
2.4 Fumaça de cigarro.....	28
2.5 Espécies reativas de oxigênio.....	31
2.6 Catalase.....	32
3. HIPÓTESES.....	34
4. JUSTIFICATIVA.....	35
5. OBJETIVOS DA PESQUISA.....	36
5.1 Objetivo geral.....	36
5.2 Objetivos específicos.....	36
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
6.1 Declaração de ética.....	37
6.2 Coleta de ovários.....	37
6.3 Obtenção do extrato da fumaça de cigarro.....	37
6.4 Desenho experimental.....	38
6.5 Avaliação da morfologia e estágio de desenvolvimento folicular.....	40
6.6 Análise da densidade do estroma.....	41
6.7 Análise das espécies reativas de oxigênio.....	41
6.8 Dosagem de proteínas (Método de Bradford).....	42
6.9 Atividade da Catalase.....	42
6.10 Análise estatística.....	43
7. RESULTADOS.....	44
7.1 Morfologia folicular.....	44
7.2 Espécies reativas de oxigênio (EROs).....	44
7.3 Catalase.....	45
7.4 Estágio de desenvolvimento folicular.....	45
7.5 Densidade das células do estroma.....	46
8. DISCUSSÃO.....	48
9. CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

Os ovários são glândulas endócrinas vitais que têm um papel central na regulação hormonal e na produção de oócitos, gametas femininos que, ao maturarem, têm a capacidade de serem fertilizados para iniciar uma gravidez. Nos mamíferos, o número de oócitos é limitado e finito, estando eles em prófase I da primeira divisão meiótica e inclusos em folículos primordiais desde o período intrauterino. Após o nascimento, novos folículos primordiais não podem ser originados, o que significa que a reserva ovariana é estabelecida desde o nascimento (KERR et al, 2013). Portanto, qualquer fator que afete a quantidade e a integridade dos folículos ovarianos primordiais pode resultar em danos significativos à capacidade reprodutiva da mulher, impactando sua saúde reprodutiva a longo prazo (BROEKMANS et al., 2009).

Dentre os fatores que podem ter efeitos prejudiciais sobre a saúde reprodutiva, destaca-se o hábito de fumar. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2021), cerca de 7,8% das mulheres globalmente ainda mantêm o hábito de fumar, com a Europa destacando-se como o continente com a maior proporção de mulheres fumantes. Tal situação é preocupante, pois o tabagismo está associado a uma série de problemas de saúde, incluindo a diminuição da receptividade uterina e a falência ovariana. De acordo com SOBINOOF et al. (2013), a exposição de camundongos à fumaça de cigarro duas vezes ao dia, durante 12 à 18 semanas, reduziu significativamente o número de folículos ovarianos, além de reduzir a qualidade e a quantidade de oócitos oócitados, impactando negativamente na fertilização dos mesmos. Esse estudo foi reforçado por MAI et al. (2014), que realizaram estudos *in vivo* administrando 2 mg/ml de extrato da fumaça de cigarro, os quais mostraram que a exposição à fumaça do cigarro levou à diminuição do tamanho dos oócitos, prejudicando sua funcionalidade e, consequentemente, a fertilização e o desenvolvimento inicial do embrião. Adicionalmente, outro estudo realizado *in vivo* com camundongos colocados em câmaras de exposição por 120 min, realizado por LI et al. (2022), mostrou que a exposição à fumaça de cigarro reduziu os folículos em todos os estágios de desenvolvimento, além de aumentar o FSH. Evidências sugerem que a exposição crônica a fumaça de cigarro pode resultar em uma superestimulação dos folículos ovarianos, como relatado em KINNEY et al. (2013), em um estudo que examinou ultrassonografias de 127 mulheres com perdas pré-fetais, seguida de cariotipagem dos abortos, encontrou uma correlação entre o consumo de tabaco e o aumento nos níveis do

FSH. Esse aumento, embora inicialmente possa parecer benéfico, pode resultar em uma diminuição da reserva folicular a longo prazo, devido ao desgaste acelerado dos folículos. GANNON et al. (2013) utilizaram camundongos fêmeas expostas à fumaça de cigarro durante 40 dias, e observaram que a fumaça de cigarro induz uma superexpressão de autofagia nas células da granulosa, resultando em uma degradação e morte celular. As descobertas obtidas até o presente momento ressaltam a relevância de investigar os mecanismos subjacentes aos danos ocasionados pela exposição à fumaça de cigarro, o que é o foco central do nosso estudo.

Uma das vias de prejuízo celular provocada pelo cigarro é mediante o estresse oxidativo: Esse estresse ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade antioxidante do organismo para neutralizá-las. As EROs são radicais livres que possuem elétrons desemparelhados e são extremamente reativas, podendo causar danos celulares e teciduais (MACHADO et al., 2009; TERRA, 2012). O corpo possui um sistema de defesa contra o estresse oxidativo, sendo constituído de defesa não enzimática, que compreende os compostos antioxidantes de origem dietética (BIANCHI et al., 1999; PRASAD et al., 2007) e defesa enzimática, que se refere às enzimas presentes no organismo que atuam minimizando a acumulação de peróxido de hidrogênio e superóxido. Nesta classe estão inseridas as enzimas superóxido dismutase, glutathione peroxidase e a catalase (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). A catalase é uma enzima classificada como oxidorreductase (ENGERS et al., 2011). É um tipo de enzima produzida por quase todos os organismos vivos, sendo responsável por neutralizar o peróxido de hidrogênio resultante do metabolismo celular e inibir lesões oxidativas (MARITIM et al., 2003).

Apesar disso, os exatos mecanismos que levam à alteração da morfologia e consequentemente à função dos folículos ovarianos e prejuízo na capacidade reprodutiva de mulheres fumantes ainda não foram totalmente elucidados. A compreensão mais profunda sobre os mecanismos pelos quais a exposição aos compostos da fumaça de cigarro prejudica as células ovarianas, contribuirá futuramente para o desenvolvimento de estratégias de prevenção dos danos associados ao tabagismo e manutenção da saúde reprodutiva feminina. O presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito do extrato da fumaça de cigarro na morfologia e estresse oxidativo de tecido ovariano caprino cultivado *in vitro*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sistema reprodutor feminino em humanos, caprinos e roedores

Em mulheres o aparelho reprodutor (Figura 1a) é composto por estruturas internas e externas. Internamente, inclui dois ovários, duas tubas uterinas, o útero e a vagina (SILVA, 2020). Externamente, é constituído pelos grandes lábios, pequenos lábios, o vestíbulo, o meato urinário, o hímen, o clitóris, o bulbo e as glândulas vestibulares (BARROS et al., 2014).

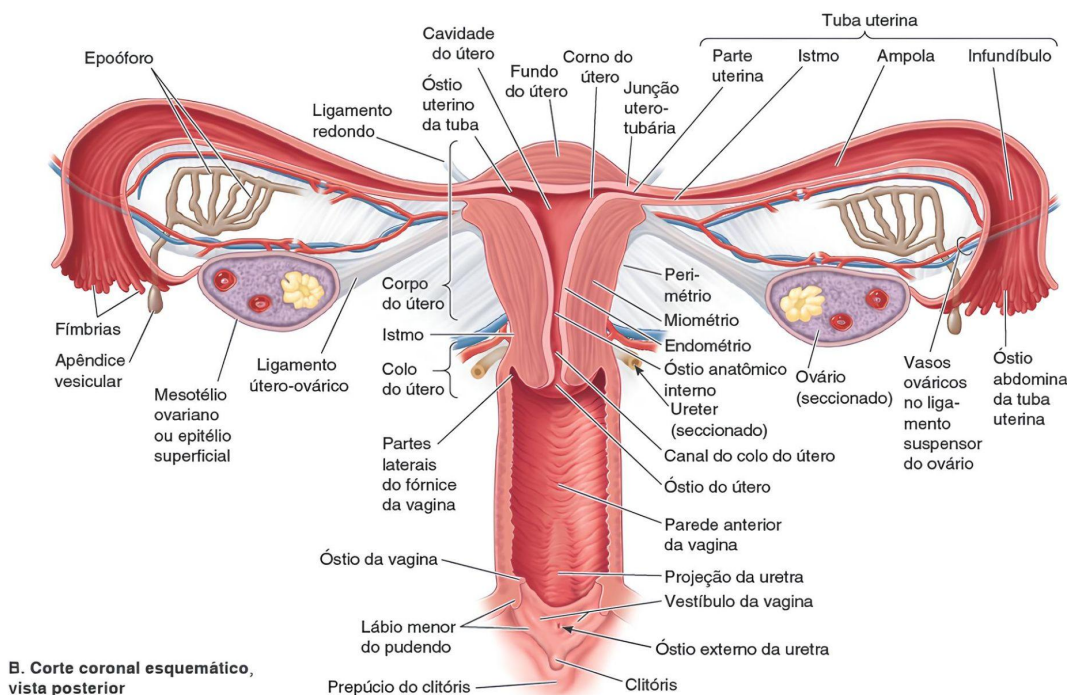
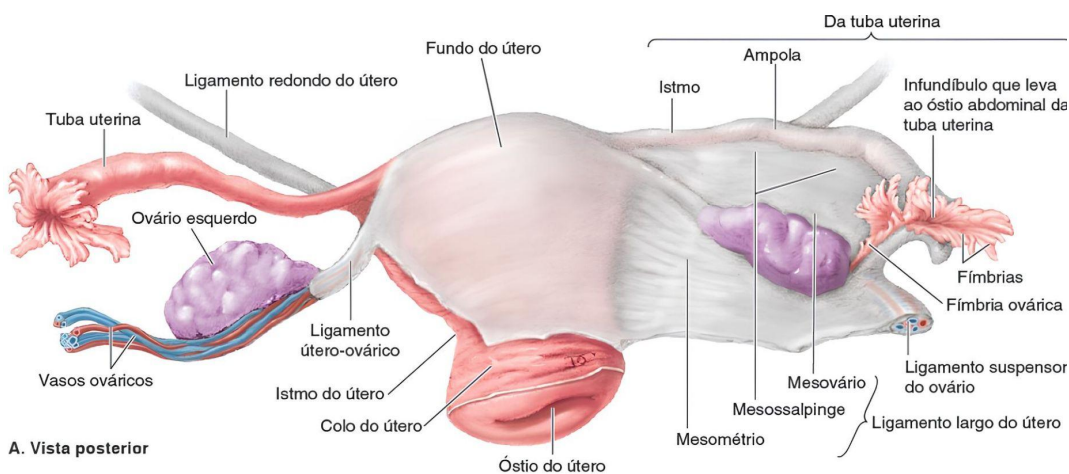


Figura 1. Anatomia do sistema reprodutor feminino em humanos. Fonte: DALLEY et al. (2024)

Para o presente estudo, os ovários são de particular interesse. Esses órgãos, localizados em cada lado do útero, desempenham funções fisiológicas essenciais, como a produção e secreção de hormônios necessários para a manutenção do trato reprodutivo e o desenvolvimento folicular. Além disso, os ovários são responsáveis pela liberação de oócitos maduros, que são cruciais para a fertilização (HIRSHFIELD, 1991; BARNETT et al., 2006; ARAÚJO et al., 2014).

Os ovários são revestidos por um epitélio germinativo e apresentam duas regiões morfológicas distintas: a medular e a cortical. A região medular, localizada internamente, fornece nutrição e suporte ao órgão e é composta por artérias, nervos, fibroblastos e veias (SILVA, 2005). A região cortical, por sua vez, é a área funcional, contendo estroma, oócitos, e células da granulosa e da teca, que, em conjunto, formam os folículos (MCGEE; HSUEH, 2000). Ademais, são encontrados corpos lúteos, hemorrágicos e albicans na região cortical do ovário mamífero (LIU et al., 2006). Na figura 2 pode-se observar a anatomia interna do ovário contendo as principais estruturas.

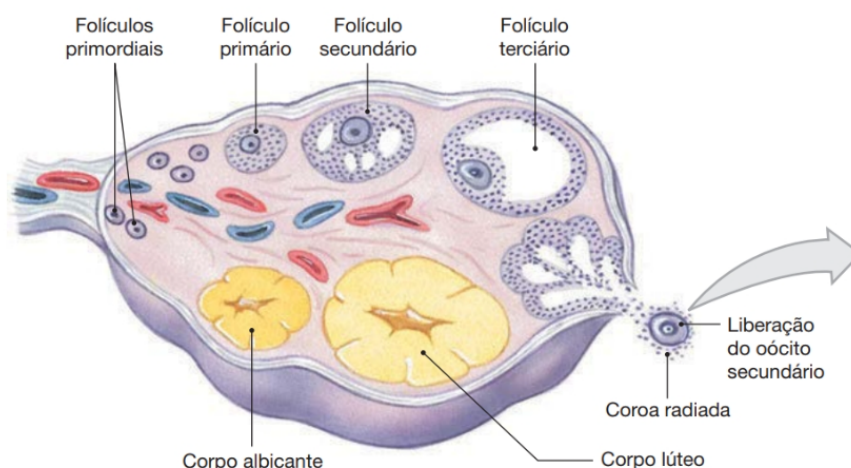


Figura 2. Anatomia interna do ovário contendo as principais estruturas. Fonte: MARTINI et al. (2009)

As tubas uterinas, também conhecidas como trompas de falôpio, sôo responsáveis pelo transporte do ovôcito em direçôo ao útero, onde um ambiente adequado para a fecundaçôo é proporcionado. O cêrvix é um canal muscular localizado na parte inferior do útero, que se

conecta ao canal vaginal. Ele desempenha a função de separar a parte externa da interna do útero, sendo dividido em endocérvice e ectocérvice. A endocérvice, a parte interna do colo do útero, é revestida por epitélio glandular, enquanto a ectocérvice, a parte externa, é coberta por epitélio escamoso (MAIA, 2012). Finalmente, a vagina, situada na extremidade do cérvix, é o local onde o sêmen é depositado durante o ato sexual (ROMANO et al., 1999). A vulva, por sua vez, refere-se ao conjunto dos órgãos externos do sistema reprodutivo feminino (BARROS; RODRIGUES, 2014).

Já o sistema reprodutor feminino dos caprinos (Figura 3) possui, assim como dos humanos, ovários, útero, tubas uterinas, cérvix ou colo uterino, vagina e vulva. No qual os ovários possuem a responsabilidade de produzir óvulos e hormônios como estrógeno e progesterona. A tuba uterina liga o ovário ao útero, e é por onde passa o óvulo após ser liberado pelo ovário. O útero é bipartido, ramificado em dois cornos uterinos, que são conectados às tubas uterinas e ao corpo do útero (RICARTE; SILVA, 2010). E, é no útero que ocorre o desenvolvimento da gestação. O cérvix, assim como o dos humanos, atua como uma barreira de proteção que separa o canal vaginal da cavidade uterina, é um conduto fibroso tubular que permite o transporte do espermatozóide e a liberação do muco (GRANADOS et al., 2006). Já a vagina liga o cérvix à vulva, parte externa do sistema reprodutor feminino, e refere-se ao local onde o macho deposita o sêmen após a ocorrência do acasalamento (EMBRAPA, 2019).

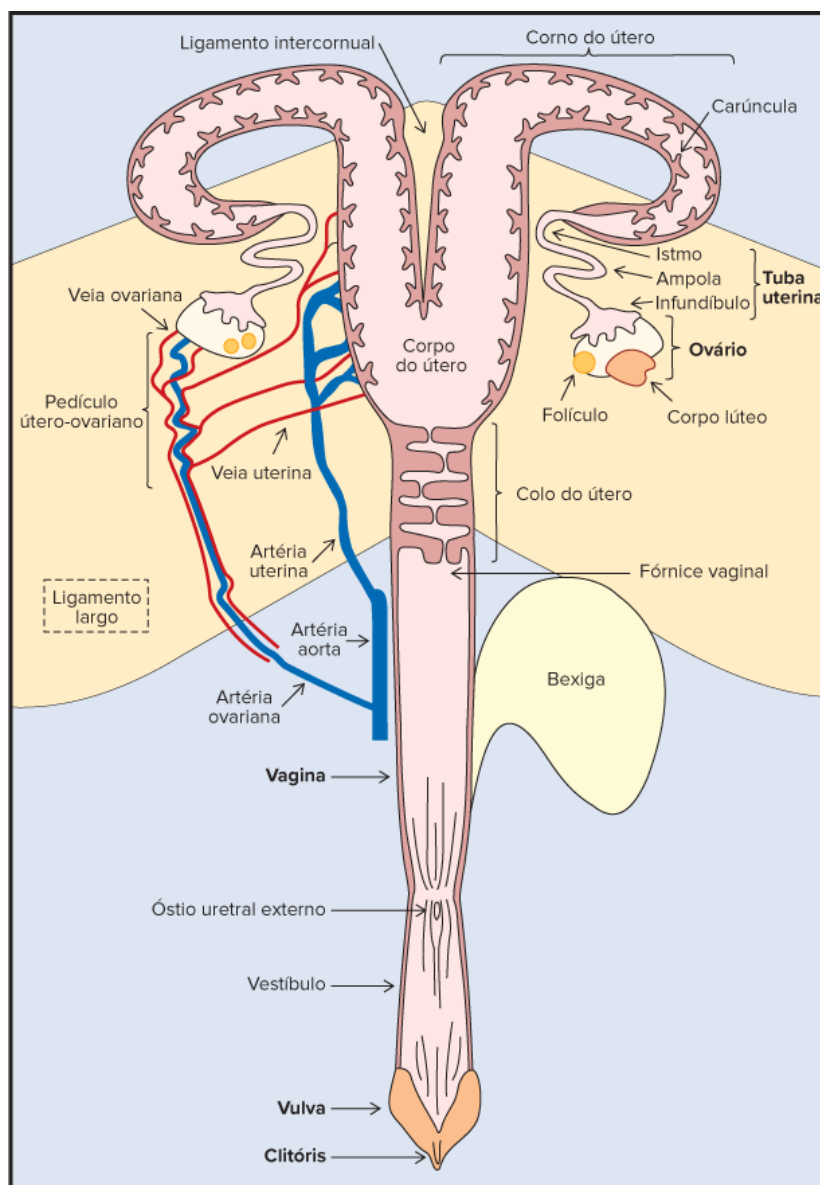


Figura 3. Anatomia do sistema reprodutor feminino em caprinos. Fonte: LUZ et al. (2023)

O sistema reprodutor dos roedores (Figura 4) é composto por uma bursa ovariana elástica e transparente rica em vasos sanguíneos, que envolve os ovários dos camundongos. Esses ovários possuem forma esférica, pesam 0,08/g, e se encontram nos pólos caudais dos rins (RENDI et al., 2012). Nos ovários são encontrados múltiplos folículos abrangendo oócitos, que, diferentemente dos humanos, nos camundongos são ovulados em maiores quantidades (GOMES et al., 2022). Além disso, os camundongos iniciam a sua puberdade com somente 28 dias de vida e o seu ciclo, denominado de ciclo estral, dura em torno de 4 à 5 dias (MARCONDES et al., 2001). O sistema reprodutor inclui também ovidutos, tubo espiralado responsável por fazer a conexão do ovário e do corno uterino. Ao contrário do útero humano, o útero dos roedores apresenta uma estrutura ramificada em dois cornos que se encontram

lateralmente e que se unem formando um corpo uterino único, onde se inicia a estrutura da vagina, que se estende até uma abertura externa (RENDI et al., 2012).

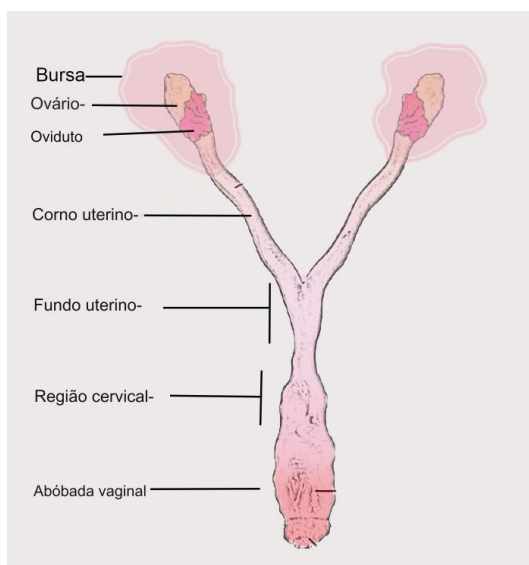


Figura 4. Anatomia do sistema reprodutor feminino em roedores. Fonte: RAJEEVE et al. (2020)

As similaridade anteriormente citadas entre os sistema reprodutor feminino de humanos, roedores e caprinos, aliado à dificuldades encontradas para a aquisição de material biológico humano, têm levado a utilização desses animais como modelo experimental animal para estudar diferentes mecanismos nos ovários (FREOUR et al., 2008; SOBINOFF et al., 2013; GANNON et al., 2013; LEE et al., 2017; LI et al., 2022). Especificamente com relação aos estudos que associam a exposição aos compostos de cigarro à geração de danos reprodutivos, a grande parte deles foram realizados utilizando pequenos roedores, no entanto, há diferenças significativas com relação à espécie humana. A tabela a seguir compara as características reprodutivas humanas com as características reprodutivas da espécie experimental utilizada em outros trabalhos, que são os roedores, e as características reprodutivas da espécie utilizada no presente estudo, que são os caprinos.

Tabela 1. Comparação entre características reprodutivas

	HUMANO	CAPRINO	ROEDOR
CICLO	⁵ Denominado de ciclo menstrual,	⁸ Denominado de ciclo estral, dura em	¹ Denominado de ciclo estral, dura entre 4-5

	dura 28 dias.	torno de 21 dias	dias
LIBERAÇÃO DE ÓVULOS	⁶ Libera um óvulo	⁸ Libera dois à três óvulo	¹⁰ São liberados vários óvulos
GESTACÃO	⁷ 270 dias	⁸ 150 dias	¹⁰ 21 dias
FOLICULOGÊNESE	⁷ Iniciada na vida fetal	³ Iniciada na vida fetal	⁷ Tem início depois de 1 ou 2 dias de nascido
PESO DO OVÁRIO	⁹ Cada ovário pesa 3 gramas	⁴ 0,5 a 3 gramas	² 0,08 gramas

Fonte: Dados adaptados de MARCONDES et al. (2002)¹; MEDEIROS et al. (2006)²; GRANADOS et al. (2009)³; GUPTA et al. (2011)⁴; TEIXEIRA et al. (2012)⁵; ALDONA et al. (2013)⁶; BATTISTON (2015)⁷; MAIA et al. (2019)⁸; NASCIMENTO (2020)⁹; GOMES et al. (2022)¹⁰

No presente estudo foi utilizada a espécie caprina como modelo experimental em função das similaridades com o ovário humano (MARCONDES et al. (2002); MEDEIROS et al. (2006); GRANADOS et al. (2009); RICARTE et al. (2010); GUPTA et al. (2011); TEIXEIRA et al. (2012); ALDONA et al. (2013); BATTISTON (2015); MAIA et al. (2019); NASCIMENTO (2020); GOMES et al. (2022)).

2.2 Folliculogênese

Independente da espécie animal, a folliculogênese refere-se a um período que inicia na formação dos primeiros folículos primordiais e finda quando o folículo atinge o estágio ovulatório (Figura 5), portanto, esse processo engloba a formação, o crescimento e a maturação do folículo (DRIANCOURT et al., 2001).

Os folículos são estruturas que abrangem o oócito e possuem como função promover uma área propícia para a maturação do mesmo (CORTVRINDT; SMITZ, 2001). Todas as mulheres já nascem com um pool de reserva de folículos ovarianos, isto é, com um número limitado de folículos, alguns milhares. No entanto, 99% desses folículos passam por um processo fisiológico inevitável denominado de atresia folicular, fazendo com que a ovulação seja inalcançada (BRUNO et al., 2008). A atresia folicular pode ocorrer por meio de duas vias, a primeira é a via apoptótica, que envolve um processo de morte celular individual e

programada, sendo caracterizada principalmente pela presença de núcleo picnótico. Nesse caso o oócito é mais afetado do que o folículo em sua totalidade. A segunda via refere-se à via degenerativa, que por sua vez é caracterizada especialmente por vacuolização citoplasmática, células desorganizadas e um acúmulo de fluido intracelular nas células da granulosa, resultando na degeneração (MARTINS et al., 2008; ARAÚJO et al., 2021).

Esses folículos passam por distintas fases de desenvolvimento, onde há a fase pré-antral ou fase independente da gonadotrofina, sendo responsável pela diferenciação do oócito e englobando os folículos em crescimento: primordiais, primários e secundários; e a fase antral ou fase dependente da gonadotrofina, que é responsável pelo aumento extensivo do folículo e que envolve os folículos terciários e pré-ovulatório (SILVA, 2005).

A regulação dos folículos pré-antrais é principalmente mediada por fatores de crescimento que atuam por mecanismos autócrinos, provenientes das próprias células foliculares, e parácrinos, provenientes de células adjacentes. Em contrapartida, durante a fase antral, a regulação é predominantemente controlada pelos hormônios folículo-estimulante (FSH) e luteinizante (LH). O FSH promove o crescimento dos folículos, enquanto o LH desempenha um papel crucial na maturação folicular e na preparação para a ovulação. Contudo, os fatores de crescimento continuam a desempenhar um papel importante no desenvolvimento dos folículos durante esta fase (WILLIAMS et al., 2012).

Quando os folículos primordiais, que constituem um estoque folicular conhecido como o pool de folículos, começam a se desenvolver, ocorre um fenômeno denominado de ativação ou recrutamento folicular (WILLIAMS et al., 2012). Esse desenvolvimento ocorre no córtex e se caracteriza pelo aumento do diâmetro oocitário, proliferação das células e transformação do formato (MACKLON et al., 2001).

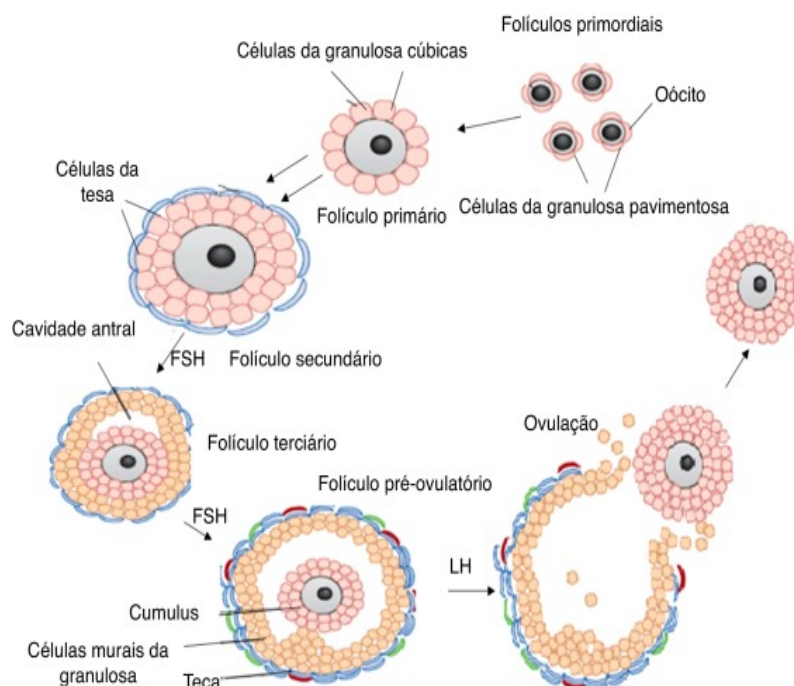


Figura 5. Foliculogênese ovariana. Fonte: GUERREIRO et al. (2015)

O folículo primordial se caracteriza pela presença de células foliculares achatadas e o oócito primário (ovogônias que passaram por mitose, diferenciação, duplicaram seus cromossomos e permanecem quiescentes na prófase da primeira divisão meiótica até que a mulher atinja a puberdade e continue a divisão meiótica) envolto por elas, e todos os folículos dessa categoria foram originados na vida fetal entre o sexto e o nono mês de gestação. Em seguida, ocorre o desenvolvimento do folículo em primário, que se destaca por ser um folículo em crescimento. Ele contém uma camada de células foliculares, algumas das quais já apresentam aparência cúbica em volta do oócito, além de uma zona pelúcida. Essa zona se refere a uma espessa camada constituída por glicoproteínas que possui funções importantes na fecundação. Seguindo o desenvolvimento, essas células foliculares com aparência cúbica se proliferam e dão origem à mais de uma camada de células foliculares com configurações cúbicas, característico do folículo secundário (MACKLON et al., 2001; SILVA, 2005), nessa fase se é possível verificar a presença de células da teca, que compreendem uma camada de células periféricas que se encontram externamente ao redor da camada da granulosa (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

De acordo com a classificação referida anteriormente, o folículo terciário e a fase pré-ovulatória atribui-se à categoria antral, e isso ocorre devido à um aumento no número de camadas e formação de espaços na camada da granulosa preenchidos por um fluido folicular

denominado de antro, que compreende uma grande quantidade de hormônios, em especial, o estrogênio e, em menores quantidades, progesterona (BARNETT et al., 2006; BESSA; DODE, 2013).

Então, os folículos terciários são determinados a partir da presença de camadas de células da granulosa e da teca, sendo elas agora: interna e externa, e o aparecimento dessa cavidade com fluido folicular (FIGUEIREDO et al., 2007). Em decorrência ao aparecimento do antro, pequenas cavidades se fundem e o antro aumenta de tamanho, graças a isso o oócito é deslocado para a periferia e as células da granulosa se diferenciam e dão origem às células do cumulus-oophorus, que revestem o oócito, e às células murais, que revestem o antro (GINTHER, et al., 2003). Essa fase é denominada de pré-ovulatória, que refere-se à fase mais desenvolvida de crescimento, onde apenas um consegue desenvolver-se e partir para a ovulação, enquanto os outros entram em atresia (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018).

Por fim, ocorre a ruptura do folículo maduro e o extravasamento do fluido com a célula gamética feminina, contendo a zona pelúcida, no qual será captado pelas tubas uterinas.

A ovulação é desencadeada por um pico de hormônio luteinizante (LH), liberado pela hipófise em resposta aos altos níveis de estrógeno. O LH estimula o rompimento do folículo maduro para secretar o óvulo, ao mesmo tempo que estimula o oócito primário a finalizar a meiose I e iniciar a meiose II, tornando-se um oócito secundário. O oócito secundário inicia então a metáfase da segunda divisão meiótica, que será completada apenas se houver fecundação (LATRONICO; KOHEK, 2001; MARTINI et al., 2009; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018). O folículo que secreta o óvulo passa a reduzir o tamanho, em uma fase denominada de corpo lúteo, onde a medida em que ele vai reduzindo, vai ocorrendo a liberação do hormônio estradiol, juntamente com a progesterona até o final da fase lútea. Caso não ocorra a fertilização, a menstruação é provocada graças à queda nos níveis de estradiol e progesterona, acarretando em uma descamação do endométrio e o aparecimento de um fluxo menstrual, logo, a fase folicular se inicia novamente (BOUZAS et al., 2010).

2.3 Cultivo *in vitro* de tecido ovariano

Uma das ferramentas utilizadas para a elucidação da foliculogênese é o cultivo *in vitro*. Na pesquisa científica, o cultivo celular tem adquirido uma relevância crescente, uma vez que proporciona uma compreensão aprofundada dos mecanismos que regulam o comportamento das células em condições *in vivo*. Ademais, essa técnica permite o controle preciso de variáveis como pH, níveis de nutrientes e hormônios, e possibilita a obtenção de resultados de

maneira mais eficiente (GASPAROTTO, 2022). Distintos sistemas de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos têm sido desenvolvidos visando preservar a viabilidade, induzir o crescimento de folículos e obter oócitos maduros (CHAVES et al., 2011). Esses sistemas podem ser classificados como: cultivo bidimensional e tridimensional (Figura 6).

No sistema de cultivo bidimensional, os folículos são isolados do córtex ovariano e cultivados diretamente sobre a placa, ou sobre uma monocamada de células ou matriz, sendo esse cultivo amplamente utilizado por proporcionar um monitoramento de forma individual dos folículos (Figura 7) (Telfer, 1998). Nesse tipo de sistema, ocorre um crescimento em monocamadas de células planas e alongadas. O mesmo possui uma menor representação do ambiente *in vivo*, visto que é realizado diretamente sob uma superfície de cultivo e, devido a isso, não possui a capacidade de distribuição fisiológica uniforme de nutrientes e oxigênio. Além disso, consistem geralmente em monoculturas, sendo possível a compreensão de apenas um tipo de célula. Em contrapartida, esse tipo de sistema costuma ser mais econômico e simples de ser manipulado (BRUNO et al., 2008; ARAÚJO et al., 2014; GONÇALVES et al., 2020; GASPAROTTO, 2022).

Já o sistema de cultivo tridimensional é capaz de preservar a morfologia do folículo e criar um ambiente *in vitro* que simula de forma mais fiel a matriz extracelular do ovário (TELFER; MCLAUGHLIN, 2008). Nesse caso, pode ser realizado o cultivo do ovário inteiro ou dos fragmentos do córtex ovariano (sistema de cultivo *in situ*), ou os folículos podem estar completamente submersos em matrizes, como alginato, misturas de alginato, ou sintéticos, como hidrogel de polietilenglicol e nanopartículas (Figura 7) (GREEN; SHIKANOV, 2016).

A figura 6 resume as principais características do cultivo *in vitro* bi e tridimensional, enquanto a figura 7 ilustra os principais sistemas utilizados para o cultivo *in vitro* de tecido ovariano.

CARACTERÍSTICA	BIDIMENSIONAL (2D)	TRIDIMENSIONAL (3D)
Microambiente e arquitetura	Simplificado	Avançado
Tipos celulares e interações	Monocamada e interação mínima	Múltiplas camadas e interações complexas
Funcionalidade	Reflete parcialmente a fisiologia <i>in vivo</i>	Interações que refletem melhor a fisiologia <i>in vivo</i>

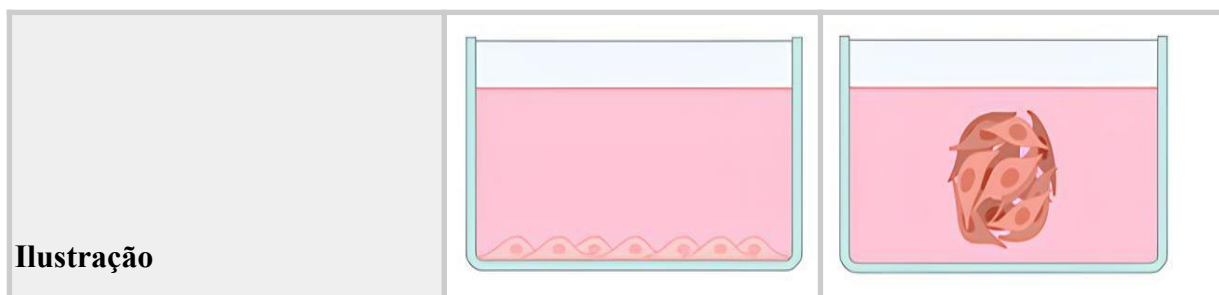


Figura 6. Cultivo *in vitro* bidimensional (2D) e tridimensional (3D). Fonte: Adaptado de RAUSCH et al., 2023.

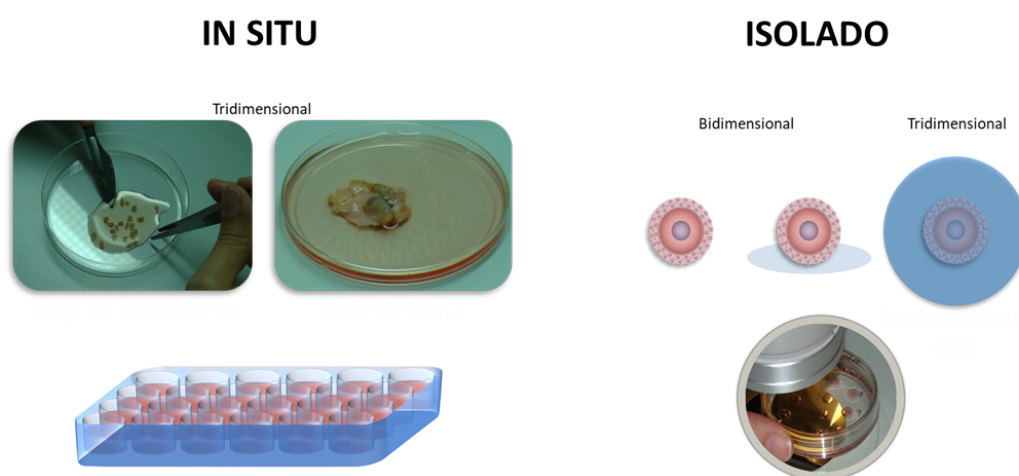


Figura 7. Principais sistemas de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos. Fonte: Autoria própria.

No presente trabalho foi utilizado o cultivo *in situ* de tecido ovariano. Esse sistema foi escolhido por: 1) possibilitar a avaliação da morfologia de folículos pré-antrais e a ativação de folículos primordiais para os estágios de crescimento; 2) preservar o contato entre os folículos e as células do estroma ovariano (ABIR et al., 2006).

Diversos estudos já vêm utilizando o cultivo *in situ* de tecido ovariano como ferramenta para avaliar o efeito de substâncias para os gametas femininos (SANTOS et al., 2006; NUNES et al., 2018; SILVA, 2023). Dentre as substâncias tóxicas que podem ser testadas utilizando esses sistemas de cultivo *in vitro* destacam-se aquelas presentes na fumaça do cigarro.

2.4 Fumaça de cigarro

O tabagismo é amplamente reconhecido por seus efeitos adversos e é uma das principais causas de mortalidade precoce em escala global. Isso ocorre devido à presença de uma ampla gama de substâncias químicas prejudiciais na fumaça do cigarro, totalizando mais de 4.700 compostos, muitos dos quais são conhecidos por suas propriedades cancerígenas, tóxicas e mutagênicas, como a nicotina, o monóxido de carbono, o benzo[a]pireno, o plutônio, as nitrosaminas e os metais pesados (SOBINOFF et al., 2012).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), em 2020 o tabagismo foi responsável por mais de 443 mil novos casos de doenças cardíacas, 52 mil acidentes vasculares cerebrais, 433 mil novos casos de doenças pulmonares. Adicionalmente, foram registrados 26 mil novos diagnósticos de câncer de pulmão e 40 mil novos diagnósticos de outros tipos de cânceres. Não se limitando a estar associado a condições graves como câncer, doenças cardiovasculares, doenças pulmonares e úlceras pépticas (NUNES et al., 2011), o tabagismo também exerce efeitos menos bem compreendidos sobre o sistema reprodutor feminino.

Comprovando isso, KINNEY et al. (2013), em um estudo que examinou ultrassonografias de 127 mulheres com perdas pré-fetais, seguida de cariotipagem dos abortos, encontrou uma correlação entre o consumo de tabaco e o aumento nos níveis do FSH. Esse aumento pode levar a uma superestimulação dos folículos ovarianos, que embora inicialmente possa parecer benéfico, pode acabar provocando uma diminuição da reserva folicular a longo prazo, devido ao desgaste acelerado dos folículos. Além disso, MAI et al. (2014), fizeram testes com 24 camundongos fêmeas, dividindo-as em três grupos. O grupo controle recebeu DMSO, o grupo CSE foi tratado com uma solução de extrato da fumaça de cigarro a 2 mg/ml (diluído em água destilada) por via oral diariamente, e o grupo menadiona, como controle positivo, recebeu uma injeção intraperitoneal (ip) de 15 mg/kg de solução de óleo de menadiona diariamente. Quatro semanas depois, todos os camundongos foram superovulados e sacrificados 14 horas após a administração de hCG, com isso foi identificado que a exposição ao extrato da fumaça de cigarro está associada a uma redução no tamanho dos oócitos. Essas modificações na morfologia dos oócitos podem comprometer sua funcionalidade e, consequentemente, sua capacidade de serem fertilizados e se desenvolverem de forma adequada. Sendo assim, as alterações hormonais e morfológicas induzidas pelo fumo não apenas afetam a qualidade dos

oócitos, mas também podem impactar negativamente o sucesso da fertilização e o desenvolvimento inicial do embrião.

SOBINOOF et al. (2013), em seu estudo expôs camundongos fêmeas via nasal à fumaça de cigarro durante 60 minutos ao dia, duas vezes ao dia, durante 12 à 18 semanas, e seus resultados mostraram que a exposição à fumaça de cigarro reduz significativamente o número de folículos, especialmente primordiais e primários, além de diminuir a qualidade e a quantidade de oócitos ovulados, o que impacta diretamente na fertilização dos mesmos. Não obstante, a exposição atua igualmente aumentando a peroxidação lipídica, isto é, e reduzindo a fluidez da membrana do oócito. Adicionalmente, outro estudo realizado por LI et al. (2022) *in vivo* com camundongos colocados em câmaras de exposição por 120 min, mostrou que a exposição à fumaça de cigarro reduziu os folículos em todos os estágios de desenvolvimento, além de aumentar o FSH, corroborando o estudo de Kinney.

GANNON et al. (2013) utilizaram camundongos fêmeas sendo expostos à fumaça de cigarro usando um sistema de exposição à fumaça de corpo inteiro, duas vezes ao dia, durante 40 dias, e observaram que a fumaça de cigarro induz uma superexpressão de autofagia nas células da granulosa, um processo celular essencial para a homeostase celular, que permite à célula degradação e reciclagem de seus nutrientes. Sua superexpressão, no entanto, resulta em sua degradação prematura, levando à morte celular.

Outros estudos mostraram que as substâncias presentes na fumaça de cigarro têm sido associadas a danos significativos ao sistema reprodutor feminino (NEAL et al., 2005; SUN et al., 2012), comprometendo a receptividade uterina e reduzindo a reserva folicular ovariana (SOARES et al., 2007), além de diminuir as taxas de sucesso em procedimentos de reprodução assistida (KLONOFF-COHEN, 2005; NEAL et al., 2005). Embora numerosos estudos evidenciam os efeitos adversos do tabagismo na saúde reprodutiva feminina, a Organização Mundial da Saúde (2021) aponta que cerca de 7,8% das mulheres globalmente continuam a fumar. A Europa, em particular, destaca-se como o continente com a maior proporção de mulheres fumantes, com uma taxa aproximada de 18%.

Entre as mais de quatro mil e setecentas substâncias identificadas na fumaça do cigarro, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), e especificamente o benzo[a]pireno (B[a]P), são notáveis pela sua alta toxicidade (SOBINOOF et al., 2012). O B[a]P, um composto tóxico e mutagênico presente em concentrações elevadas na fumaça do cigarro e está intimamente

associado ao aumento do estresse oxidativo e a apoptose celular. Estudos indicam que o benzo(a)pireno aumenta a produção de EROs e causa danos diretos ao DNA embrionário (ZHAN et al., 2015). Ademais, esses compostos tóxicos costumam se acumular principalmente nos órgãos reprodutivos, o que aumenta os riscos (MAI et al., 2014). Este composto promove a destruição dos folículos primordiais por meio de um mecanismo homeostático de recrutamento, o qual acelera o desenvolvimento dos folículos para substituir os folículos em crescimento (SOBINOFF et al., 2012). Estudos realizados por SADEU e FOSTER (2011) demonstraram que o B[a]P inibe o desenvolvimento dos folículos antrais, reduz a produção de hormônio antimülleriano (AMH) e estradiol, e compromete a sobrevivência dos folículos.

Ademais, a nicotina, um alcalóide presente no tabaco, merece uma atenção especial. Ela é a maior responsável pela dependência do cigarro, uma vez que atua na liberação de dopamina, gerando sensações de prazer que contribuem para a compulsão pelo cigarro. Durante o ato de fumar, a nicotina é absorvida em média de 1,0 mg por cigarro e direcionada predominantemente aos bronquíolos terminais e alvéolos pulmonares. Após sua absorção na circulação sanguínea, a nicotina é distribuída de forma moderada pelos diversos tecidos corporais, incluindo o cérebro e os pulmões (MARTINS, 2022). A concentração de nicotina no sangue arterial, que é transportado pelas artérias provenientes dos pulmões, pode ser até 10 vezes superior à encontrada no sangue venoso. Apesar de a meia-vida da nicotina ser de até duas horas, a intoxicação por essa substância pode persistir, dado que, mesmo após sua degradação, resíduos de nicotina continuam acumulados no organismo (ROSEMBERG et al., 2004). A nicotina, devido à sua elevada toxicidade, está associada a diversas condições patológicas graves, incluindo infarto do miocárdio, hipertensão, acidentes vasculares cerebrais, angina do peito, câncer e disfunção sexual. Estudo realizado por BLACKBURN e colaboradores (1994) mostraram que a nicotina possui efeito inibitório na ovulação, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, bem como possui efeito inibitório na fertilização dos oócitos ovulados.

Conforme relatado pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2022), o tabagismo em mulheres resulta em uma diminuição significativa na taxa de fertilidade, que cai para cerca de 57%, e na taxa de concepção, em virtude da presença de nicotina no fluido folicular. A exposição aos compostos químicos presentes na fumaça do cigarro também está associada à depleção dos folículos ovarianos. Além disso, o tabagismo eleva em aproximadamente 30% o

risco de infertilidade, assim como aumenta a probabilidade de abortos espontâneos, partos prematuros e descolamento da placenta, entre outras complicações obstétricas.

É consenso na literatura que um dos mecanismos pelos quais a fumaça do cigarro provoca prejuízos celulares é através do estresse oxidativo, um fenômeno caracterizado pelo excesso de moléculas oxidantes, com destaque para espécies reativas de oxigênio, que pode resultar em danos celulares, incluindo indução de apoptose e necrose (AOSHIBA; NAGAI, 2003; RAMAGE et al., 2006).

2.5 Espécies reativas de oxigênio

As Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) são íons, moléculas ou átomos que contêm um ou mais elétrons de oxigênio desemparelhados, sendo assim, são caracterizadas como radicais livres que se formam principalmente por meio de reações bioquímicas durante a respiração celular, exercendo um papel ambíguo na saúde ovariana. Elas são formadas em várias organelas celulares, incluindo a membrana plasmática, o citoplasma, o núcleo, o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi, as mitocôndrias, sendo elas as organelas mais presentes nos oócitos (SUN et al., 2020). A sua principal origem está intimamente ligada a processos inflamatórios e a disfunções mitocondriais (JUE et al., 2022).

Em condições normais, existe um equilíbrio entre a geração de EROs e o sistema antioxidante, permitindo ao organismo manter níveis fisiológicos apropriados dessas substâncias, sendo essenciais tanto para a função fisiológica ovariana quanto para a atuação como mensageiros secundários na sinalização celular, sendo participantes essenciais na síntese de proteínas, na sinalização intracelular e transcrição gênica (TOUZ; SCHIFFRIN, 2000). Entretanto, a produção excessiva pode sobrecarregar o sistema de defesa antioxidante, resultando em estresse oxidativo. Esse desequilíbrio pode culminar em uma variedade de implicações biológicas, incluindo lesões teciduais, mutações, comprometimento do sistema imunológico, danos irreversíveis ao ovário e comprometimento da qualidade dos folículos cultivados, além da elevada taxa de morte folicular (ANDRADE et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2014; SAEED-ZIDANE et al., 2017). Ademais, tal condição pode favorecer o surgimento de doenças ovarianas, como câncer de ovário, síndrome dos ovários policísticos (SOP) e endometriose ovariana (AGARWAL et al., 2012; KANG et al., 2020; JUAN et al., 2021; LIANG et al., 2023).

EROs são notoriamente reativas, o que implica sua capacidade de interagir com diversas substâncias, atuando tanto como doadoras quanto como receptoras de elétrons (TERRA, 2012; GRIENDLING; USHIO-FUKAI, 2000; HARRISON; GONGORA, 2009).

O corpo possui um sistema de defesa contra o estresse oxidativo, sendo constituído de defesa não enzimática, que compreendem os compostos antioxidantes de origem dietética, obtidos através da alimentação, tais como: vitamina C, precursores de vitamina E, β -caroteno, zinco, selênio, dentre outros (BIANCHI et al., 1999; PRASAD et al., 2007). E defesa enzimática, que se refere às enzimas presentes no organismo que atuam minimizando a acumulação de peróxido de hidrogênio e superóxido. Nesta classe estão inseridas as enzimas superóxido dismutase, sendo essas responsáveis pela conversão do superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio; Glutathione peroxidase, que possui a capacidade de remover peróxido de hidrogênio e reduzi-lo de forma indireta à água; E a catalase, que catalisa o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

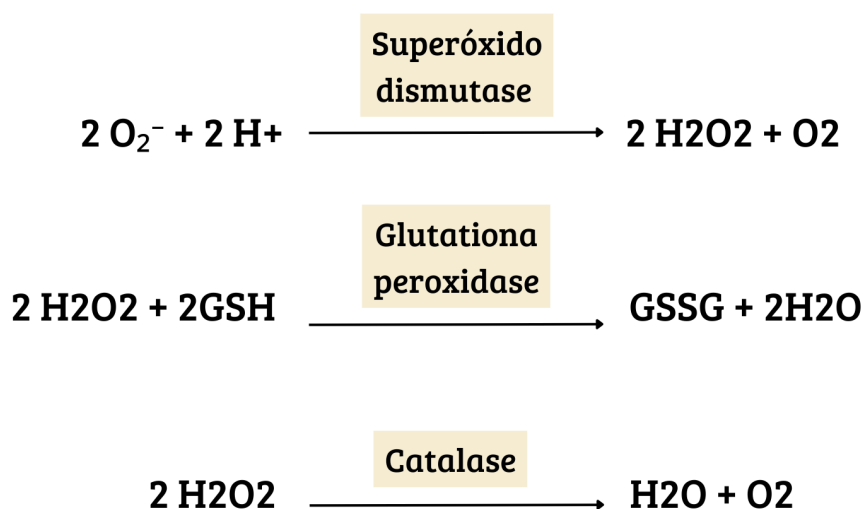


Figura 8. Esquema ilustrativo das reações catalisadas pelas enzimas SOD, GPX e CAT.
Fonte: Adaptado de Hopkins (2019).

2.6 Catalase

A catalase (CAT) é uma enzima classificada como oxidorreductase, isto é, capaz de catalisar reações de oxidação, encontrada nas mitocôndrias e peroxissomos (ENGERS et al., 2011). É um tipo de enzima produzida por quase todos os organismos vivos, sendo responsável por neutralizar o peróxido de hidrogênio resultante do metabolismo celular e inibir lesões

oxidativas (MARITIM et al., 2003). A catalase atua decompondo duas moléculas de peróxido de hidrogênio em uma molécula de oxigênio e outra de água (NANDI et al., 2019).

O peróxido de hidrogênio, quando não metabolizado pela enzima antioxidante catalase, pode se tornar altamente reativo. Essa reatividade permite que ele inicie a peroxidação lipídica, um processo de oxidação de ácidos graxos poli-insaturados. Esses ácidos graxos são componentes fundamentais das membranas celulares e de organelas. O processo de oxidação lipídica é iniciado quando ocorre uma interação entre um ácido graxo poli-insaturado com um radical hidroxila, resultando na remoção de hidrogênio do ácido graxo e na formação de um radical lipídico. Esse radical se transforma rapidamente em um radical peróxido, ao reagir com moléculas de oxigênio. Posteriormente, o radical peróxido interage com outro ácido graxo, retirando um hidrogênio e formando um hidroperóxido e um radical lipídico, fazendo com que a reação se perpetue.

Dessa forma, a peroxidação pode comprometer a integridade das membranas, levando à perda da fluidez e ao extravasamento do conteúdo de organelas, contribuindo para processos patológicos. A importância da catalase se torna evidente, prevenindo assim esses danos e assegurando a manutenção da saúde celular (VANNUCCHI et al., 1998; VASCONCELOS et al., 2014).

3. HIPÓTESES

H0: O extrato da fumaça de cigarro não prejudica a morfologia folicular e portanto não impacta a saúde reprodutiva da fêmea.

H1: O extrato da fumaça de cigarro prejudica a morfologia de folículos ovarianos cultivados in situ devido ao aumento desenfreado da produção de espécies reativas de oxigênio, causando estresse oxidativo e impactando negativamente a saúde reprodutiva da fêmea.

4. JUSTIFICATIVA

A saúde reprodutiva feminina é diretamente impactada pela exposição aos componentes do cigarro, com estudos evidenciando que essa exposição pode levar a depleção de folículos primordiais, resultando em problemas na ovulação e fecundação. Apesar de reconhecermos essa correlação, os mecanismos exatos que desencadeiam a infertilidade não estão completamente claros. Especificamente com relação a elucidação dos mecanismos que levam à alteração da morfologia do pool de reserva folicular ovariano ainda há uma lacuna de conhecimento, com estudos anteriores utilizando apenas roedores como modelo experimental. A espécie caprina, graças a sua maior semelhança biológica com os humanos, comparada aos roedores, apresenta-se como uma boa opção de modelo experimental para explorar os mecanismos dos efeitos do extrato da fumaça de cigarro, tornando-se mais relevante quando considerada a dificuldade em obter fragmentos ovarianos humanos para estudo.

Compreender melhor os mecanismos de desgaste do pool de reserva folicular ovariana pela exposição aos compostos da fumaça de cigarro não apenas é fundamental para a ciência básica reprodutiva, mas também possibilita intervenções potenciais, por exemplo, a identificação de substâncias que possam prevenir a ativação desses mecanismos, como antioxidantes, para proporcionar uma proteção aos ovários de mulheres fumantes. Sendo assim, essa pesquisa visa contribuir para a elucidação dos impactos da fumaça de cigarro na reprodução feminina e futuramente possibilitar o desenvolvimento de possíveis estratégias de mitigação.

5. OBJETIVOS DA PESQUISA

5.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do extrato da fumaça de cigarro sobre morfologia e estresse oxidativo de tecido ovariano caprino após cultivo *in vitro*

5.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito de diferentes concentrações do extrato de fumaça de cigarro sobre a morfologia dos folículos caprinos cultivados *in situ*;

Identificar a categoria folicular mais suscetível à exposição do extrato de fumaça de cigarro *in situ*;

Analisar o impacto da exposição *in vitro* ao extrato da fumaça de cigarro nas células do estroma ovariano caprino;

Quantificar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em diferentes concentrações do extrato de fumaça de cigarro;

Avaliar a atividade da catalase nas diferentes concentrações do extrato de fumaça de cigarro após cultivo *in vitro* de tecido ovariano caprino.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Declaração de ética

Os ovários foram obtidos exclusivamente de abatedouro local e a sua utilização está de acordo com a Legislação Brasileira para cuidado e uso de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica, eliminando, portanto, a obrigatoriedade de aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA).

6.2 Coleta de ovários

Os tecidos corticais ovarianos foram obtidos de 6 ovários. Após a coleta, os ovários foram submetidos a uma lavagem inicial em álcool 70%, seguida por duas lavagens em solução salina (0,9%), a qual foi suplementada com 100 µg/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Os ovários foram transportados para o laboratório dentro de um período máximo de 30 minutos na mesma solução, mantidos a uma temperatura de 4°C.

6.3 Obtenção do extrato da fumaça de cigarro

O preparo do extrato aquoso de fumaça de cigarro (EFC) seguiu o protocolo proposto por GELLNER et al. (2016), com o objetivo de extrair os constituintes presentes na fumaça de cigarro. Foram utilizados cigarros comerciais com filtro (Marlboro Red, Philip Morris, EUA), os quais possuem níveis elevados de nicotina (BRAUN et al 2019; PM, 2022). O sistema para coleta do EFC utilizou uma seringa graduada de 60 mL, com a ponta acoplada a mangueira de silicone flexível e transparente. A mangueira transpassou um dos orifícios confeccionados na tampa de um tubo cônico de 50 mL tipo Falcon. Na outra extremidade da mangueira, localizada na parte interna do tubo, foi acoplada uma ponteira de 1000 µL, conforme pode ser observado na Figura 9. Através do segundo orifício na tampa do tubo, outra mangueira flexível foi transpassada e na extremidade externa ao tubo, o cigarro foi conectado e acesso. As mangueiras flexíveis foram enroladas com papel alumínio devido a propriedade fotossensível da nicotina. O tubo permaneceu com o líquido visível para observação da possível formação de bolhas durante as aspirações, sendo coberto com papel alumínio tão logo finalizada a coleta.

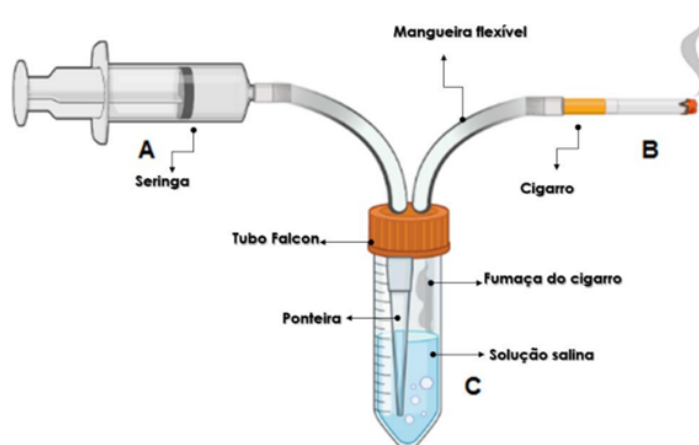


Figura 9. Sistema para coleta do extrato aquoso da fumaça de cigarro (EFC). Fonte: Adaptado de GELLNER et al. (2016).

O preparo desta amostra foi realizado imediatamente antes do uso no experimento. Para a coleta do EFC, utilizou-se 35 mL de solução salina (NaCl a 0,9%) para cada 08 cigarros, sendo conectado um cigarro por vez na extremidade da mangueira do sistema de coleta. No processo de coleta, com uso de um cronômetro, foram reproduzidas aspirações de 35 mL, puncionando lentamente o êmbolo da seringa entre 2 s e 4 s, repetindo após 30 s. A fumaça aspirada percorreu a mangueira flexível até o interior do tubo, borbulhando na solução. Cada cigarro foi queimado até o comprimento delimitado pelo início do filtro amarelo, sendo realizado entre 8 a 10 punções do êmbolo da seringa para finalizar a queima. O procedimento foi repetido com cada cigarro, observando a existência de possíveis vazamentos no sistema e reparando a vedação caso necessário, evitando assim a perda dos teores de nicotina. Todo procedimento foi realizado em capela de exaustão. Ao final da coleta, realizou-se o ajuste do pH da solução para 7,4 e o EFC foi fracionado em alíquotas para as análises químicas e *in vitro*. Foi realizado HPLC com o padrão de nicotina (Sigma) e foi confirmada a presença de nicotina no extrato. Foi verificado um teor total de 154,90 µg/mL no extrato total (solução considerada como 100%) e a partir desta, foram diluídas as soluções de uso em solução salina (NaCl a 0,9%) de 2,5% e 5% com as seguintes concentrações de nicotina, respectivamente: 3,96 µg/mL e 7,92 µg/mL.

6.4 Desenho experimental

Amostras de tecido de cada par ovariano foram fragmentadas em cinco unidades com

dimensões de 3x3x1 mm utilizando pinça e bisturi sob condições estéreis. Dos cinco fragmentos obtidos, dois foram fixados diretamente para análise histológica, representando o controle fresco não cultivado, enquanto os outros três fragmentos foram submetidos ao cultivo. Os fragmentos foram colocados em placas de cultura de 24 poços, cada uma contendo 1 mL do meio de cultivo. O cultivo foi realizado a 39°C com 5% de CO₂ em uma incubadora umidificada, por sete dias. Todos os meios de cultivo foram incubados por 1 hora antes do uso. O meio básico utilizado foi α -MEM (pH 7,2 - 7,4) suplementado com ITS (insulina 6,25 μ g/mL, transferrina 6,25 μ g/mL e selênio 6,25 ng/mL), piruvato a 0,23 mM, glutamina a 2 mM, hipoxantina a 2 mM, e 1,25 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), sendo denominado α -MEM+. Para o cultivo *in vitro*, os fragmentos foram cultivados em α -MEM+ (controle cultivado), ou neste meio acrescido de extrato de fumaça de cigarro (EFC) em diferentes concentrações (2,5%, e 5%), constituindo os tratamentos EFC: 2,5%, e 5%. Foram realizadas três réplicas para cada tratamento e o meio de cultivo foi renovado em dias alternados. Para melhorar a compreensão, os resultados obtidos foram apresentados em duas categorias: controle (fresco e cultivado em meio α -MEM+) e Extrato da Fumaça do Cigarro (EFC 2,5% e 5%), constituindo os seguintes tratamentos: fresco, α -MEM+, 2,5% e 5%.

Para a avaliação da morfologia folicular, os fragmentos foram fixados em solução de Carnoy por 12 horas antes do cultivo (controle fresco não cultivado) e após 7 dias de cultivo (α -MEM+ (controle cultivado); EFC 2,5% e 5%). Subsequentemente, os fragmentos foram desidratados em etanol com concentrações crescentes. Após a inclusão em parafina, os tecidos foram seccionados em cortes de 7 μ m, os quais foram montados em lâminas de vidro e corados com o Ácido Periódico de Schiff (PAS).

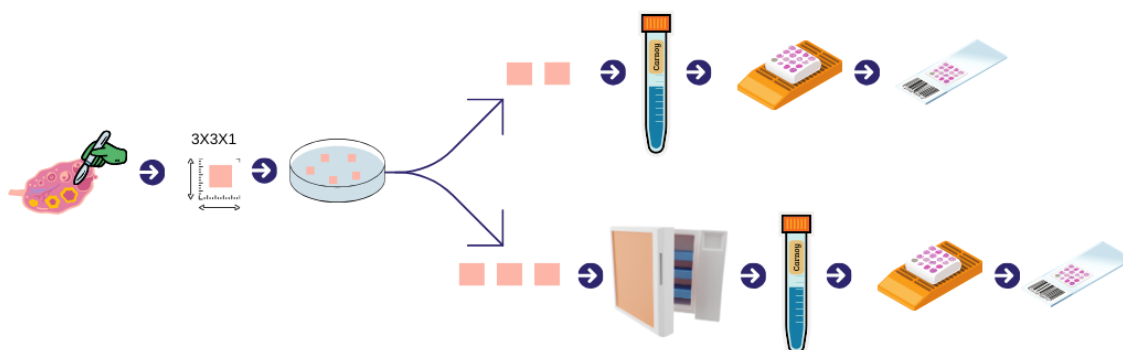


Figura 10. Fluxograma ilustrando o desenho experimental. Fonte: Autoria própria



Figura 11. Preparação da placa de 24 poços para o cultivo *in vitro* dos fragmentos ovarianos durante. Fonte: Autoria própria.

6.5 Avaliação da morfologia e estágio de desenvolvimento folicular

A análise da morfologia e do estágio de desenvolvimento folicular foram realizados por microscopia óptica (Leica DM500). Os folículos foram considerados como morfológicamente normais quando apresentaram um oócito intacto, com citoplasma homogêneo, cercado por células da granulosa bem organizadas em uma ou mais camadas e sem núcleos picnóticos (Figura 12a e 12b); ou como degenerados quando apresentavam oócito retraído ou com núcleo picnótico e/ou se estiverem rodeados por células da granulosa desorganizadas e destacadas da membrana basal (Figura 12c).

Os folículos pré antrais foram classificados quanto ao estágio de desenvolvimento em primordiais ou em crescimento. Foram classificados como primordiais (seta vermelha na Figura 12a) aqueles que apresentavam uma camada de células da granulosa achatadas ao redor do oócito; foram considerados folículos em crescimento aqueles nos quais houve modificação do formato de células da granulosa de pavimentoso para cúbico, com uma ou mais camada de células da granulosa ao redor do oócito (seta amarela na Figura 12b).

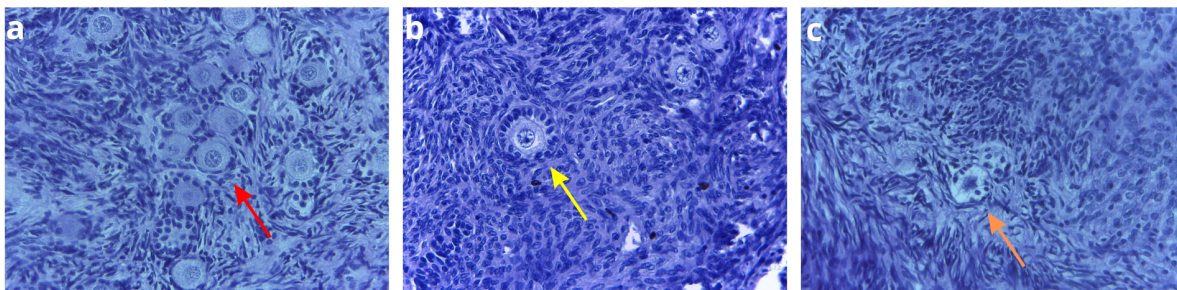


Figura 12. Estágios de desenvolvimento folicular. A letra “a” refere-se ao folículo em estágio primordial (Seta vermelha). A letra “b” refere-se ao folículo em estágio de crescimento (Seta amarela). A letra “c” refere-se ao folículo degenerado (Seta laranja). Imagens obtidas por microscopia com aumento de 40x. Fonte: Autoria própria.

6.6 Análise da densidade do estroma

A análise da densidade do estroma foi realizada com base na metodologia descrita por SILVA et al. (2022) com adaptações específicas para a calibração da leitura das células desejadas, tanto em relação ao tamanho celular quanto à área a ser analisada. Este método envolve a utilização de um script conhecido como CmyoSize executado no software ImageJ. Inicialmente, as células do estroma foram fotografadas (Figura 13) em um aumento de 40x. As imagens obtidas, foram importadas para o ImageJ, onde o script foi aplicado. Esse script atua isolando as partículas de interesse, eliminando os espaços vazios e gerando valores para a área total e para a quantidade de células presentes na referida área.

6.7 Análise das espécies reativas de oxigênio

O método adaptado de CHOI et al. (2006) baseia-se na interação do sal azul de nitrotetrazólio (NBT) com espécies reativas de oxigênio, sendo que aproximadamente 90% desse sal reage exclusivamente com o ânion superóxido. Para iniciar a análise, cada eppendorf foi identificado e, em seguida, adicionado 100 μ L da amostra a cada eppendorf correspondente. Adicionou-se 100 μ L de NBT a 0,1% (dissolvido em PBS). Os eppendorfs foram então incubados em estufa a 37°C por um período de 45 a 60 minutos. Após a incubação, adicionou-se 500 μ L de PBS a cada eppendorf, seguido pela centrifugação a 2600 RPM por 10 minutos. Após a centrifugação, fez-se necessário deixar apenas 250 μ L da solução no eppendorf. Em seguida, adicionou-se 250 μ L de uma solução de KOH+DMSO (preparada com 5400 μ L de KOH a 2 M e 6300 μ L de DMSO, totalizando 11700 μ L) e realizou-se a solubilização da mistura por agitação (movimentos de cima para

baixo). Esta mistura foi então transferida para uma placa de 96 poços em duplicatas e lida em um leitor de ELISA a 630 nm. Os resultados foram expressos em gramas de formazan por volume de células.

6.8 Dosagem de proteínas (Método de Bradford)

A determinação da concentração de proteínas no meio coletado foi realizada utilizando o método de Bradford (1976). Este procedimento emprega o corante azul de Coomassie para quantificar a concentração total de proteínas em cada amostra de extrato. A interação do corante com as proteínas resulta na formação de um complexo que emite uma luminescência azul. A absorbância deste complexo está diretamente correlacionada à concentração de proteínas na amostra e foi mensurada espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 595 nm. A concentração total de proteínas nas amostras foi calculada com base em uma curva padrão elaborada utilizando a albumina bovina como padrão de referência, a qual foi posteriormente utilizada para a padronização dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs). Para a análise inicial, foi realizada a pesagem da Albumina Sérica Bovina (BSA) para a preparação da curva padrão, seguida pela diluição da BSA para uma concentração de 1 mg/mL utilizando água deionizada. Após a construção da curva padrão, foi realizado um teste preliminar para determinar o volume ideal da amostra e do reagente de Bradford, garantindo que a intensidade do azul obtida durante a leitura não extrapole os limites da curva padrão. Em seguida, a preparação das amostras foi realizada em placas de microtitulação, utilizando 1 µL de amostra e completando com 199 µL de solução de Bradford, com homogeneização lenta após cada preparo. Finalmente, a leitura foi efetuada em um leitor de microplacas a um comprimento de onda de 595 nm.

6.9 Atividade da Catalase

A atividade da catalase foi avaliada conforme o método proposto por Aebi, H (1984), que permite acompanhar a degradação do peróxido de hidrogênio por meio da absorbância a 240 nm. Os reagentes empregados foram o tampão fosfato (PBS) ajustado para pH 7,4 e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A combinação foi realizada utilizando 4 mL de PBS para 64 µL de H_2O_2 . Para as medições, foi realizada a leitura do branco 01 com apenas o PBS e do branco 02 com a mistura. Para a análise, foram utilizados 100 µL da amostra com 900 µL do mix, sendo as leituras feitas nos tempos de 0, 30 e 60 segundos a uma comprimento de onda de 240 nm.

6.10 Análise estatística

Todos os dados foram analisados utilizando o software estatístico GraphPad Prism. Os resultados foram expressos como média $\pm$ SEM e submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido de teste de Tukey. Os valores foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

7. RESULTADOS

7.1 Morfologia folicular

O percentual de folículos morfologicamente normais antes (controle fresco) e após sete dias de cultivo *in vitro* na ausência (α -MEM+) ou presença de diferentes concentrações de extrato da fumaça de cigarro (EFC: 2,5% e 5%) está ilustrada no gráfico 1. Foi observada uma redução significativa no percentual de folículos morfologicamente normais nos tratamentos com EFC (2,5%: $42,23\% \pm 9,89$; 5%: $37,77\% \pm 7,99$) quando comparado ao controle fresco ($92\% \pm 3,99$) e cultivado ($85\% \pm 5,00$) ($P < 0,05$). Não houve diferença significativa entre o percentual de folículos morfologicamente normais quando comparado o controle fresco com o α -MEM+ (controle cultivado) ($P > 0,05$). Foram encontradas taxas similares de folículos morfologicamente normais nos tratamentos EFC 2,5% e 5% ($P > 0,05$).

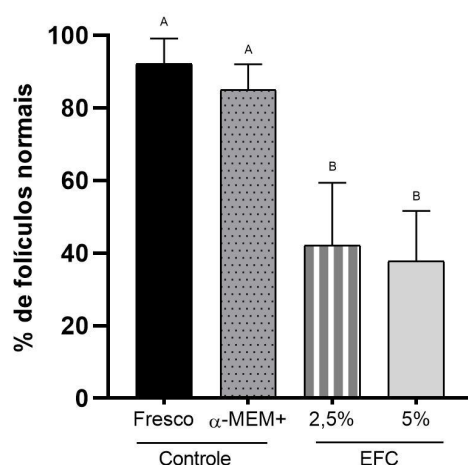


Gráfico 1. Percentual de folículos morfologicamente normais antes (controle fresco) e após sete dias de cultivo *in vitro* na ausência (α -MEM+) ou presença de diferentes concentrações de extrato da fumaça de cigarro (EFC: 2,5% e 5%). ^{AB} mostra diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).

7.2 Espécies reativas de oxigênio (EROs)

A dosagem de espécies reativas de oxigênio após sete dias de cultivo *in vitro* na ausência (α -MEM+) ou presença de diferentes concentrações de extrato da fumaça de cigarro (EFC: 2,5% e 5%) está evidenciada no gráfico 4. Não houve diferença estatística entre os

tratamentos avaliados (α -MEM+: $169,0 \pm 27,7$; EFC 2,5%: $199,6 \pm 26,7$; EFC 5%: $206,2 \pm 31$)($P>0,05$).

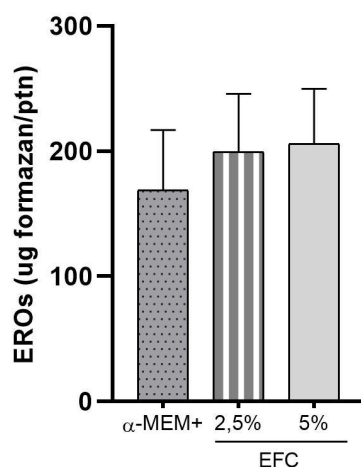


Gráfico 2. Dosagem de espécies reativas de oxigênio após sete dias de cultivo *in vitro* na ausência (α -MEM+) ou presença de diferentes concentrações de extrato da fumaça de cigarro (EFC: 2,5% e 5%) ($P>0,05$).

7.3 Catalase

Tabela 2. Atividade da catalase após sete dias de cultivo *in vitro* na ausência (α -MEM+) ou presença de diferentes concentrações de extrato da fumaça de cigarro (EFC: 2,5% e 5%).

Tratamento	Média $\pm$ SEM
α -MEM+	$8,33 \pm 1,76$
2,5%	$4,67 \pm 1,45$
5%	$2,73 \pm 1,13$

Os dados mostram que não houve diferença significativa entre os tratamentos avaliados. ($P>0,05$).

7.4 Estágio de desenvolvimento folicular

O percentual de folículos primordiais e em crescimento antes (controle fresco) e após sete dias de cultivo *in vitro* na ausência (α -MEM+) ou presença de diferentes concentrações de extrato da fumaça de cigarro (EFC: 2,5% e 5%) está representado no gráfico 2.

Foi observada uma menor taxa de folículos primordiais (Gráfico 2a) em todos os tratamentos cultivados (α -MEM+: 15,56% $\pm$ 4,84; EFC 2,5%: 18,89% $\pm$ 2,94 e EFC 5%: 14,44% $\pm$ 2,94) quando comparado ao controle fresco (43,33% $\pm$ 3,84) ($P>0,05$). No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre o grupo α -MEM+ e os grupos contendo 2,5% e 5% de EFC ($P>0,05$).

Já com relação aos folículos em crescimento (Gráfico 2b), foi observado um percentual significativamente superior no tratamento α -MEM+ (70% $\pm$ 3,33) quando comparado aos tratamentos na presença de EFC: 2,5% (23,33% $\pm$ 6,9); 5% (23,33% $\pm$ 5,77) ($P<0,05$). No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre o controle fresco e o α -MEM+ ($P>0,05$). Assim como não foram observadas diferenças entre o controle fresco e os grupos de tratamento contendo 2,5% e 5% de EFC ($P>0,05$).

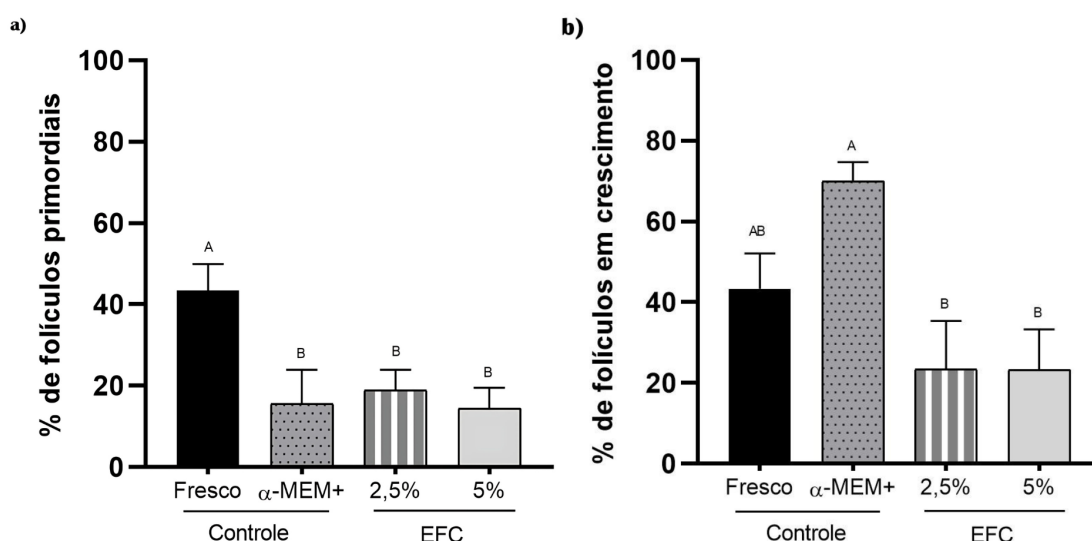


Gráfico 3. Percentual de folículos primordiais (a) e em crescimento (b) antes (controle fresco) e após sete dias de cultivo *in vitro* na ausência (α -MEM+) ou presença de diferentes concentrações de extrato da fumaça de cigarro (EFC: 2,5% e 5%). ^{AB} mostra diferença significativa entre os tratamentos ($P<0,05$).

7.5 Densidade das células do estroma

O gráfico 3 demonstra os resultados da análise da densidade das células do estroma antes (controle fresco) e após sete dias de cultivo *in vitro* na ausência (α -MEM+) ou presença de

diferentes concentrações de extrato da fumaça de cigarro (EFC: 2,5% e 5%). Não houve diferença significativa entre os tratamentos avaliados (controle fresco: $30,65 \pm 2,6$; α -MEM+: $32,93 \pm 1,0$; EFC 2,5%: $33,93 \pm 1,2$; EFC 5%: $36,65 \pm 1,4$) ($P > 0,05$).

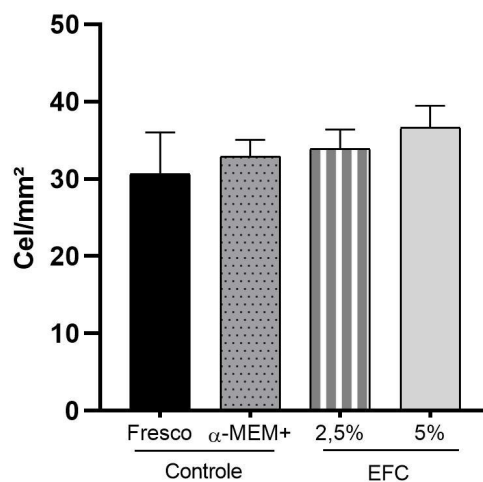


Gráfico 4. Densidade das células do estroma antes (controle fresco) e após sete dias de cultivo *in vitro* na ausência (α -MEM+) ou presença de diferentes concentrações de extrato da fumaça de cigarro (EFC: 2,5% e 5%)($P > 0,05$).

8. DISCUSSÃO

Nosso trabalho foi o primeiro a avaliar o impacto do extrato da fumaça de cigarro no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos, analisando seus efeitos na morfologia, categoria folicular, densidade de células do estroma, produção de espécies reativas de oxigênio e atividade da catalase.

Com relação à avaliação da morfologia folicular, foi observada uma redução significativa no percentual de folículos morfologicamente normais após sete dias de cultivo na presença do extrato da fumaça de cigarro (EFC), independente da concentração avaliada, quando comparado ao controle fresco e o controle cultivado. Adicionalmente, o controle cultivado foi capaz de manter taxas de folículos morfologicamente normais similares ao controle fresco. Estudos anteriores têm testado isoladamente diferentes compostos presentes no extrato da fumaça de cigarro e demonstrado seus impactos na reserva folicular ovariana, evidenciando os riscos do tabagismo. STEFANS DOTTIR et al. (2023) investigaram o efeito que o benzo[a]pireno, um componente presente na fumaça de cigarro, possui no desenvolvimento ovariano fetal de camundongos fêmeas. Para esse estudo foi utilizado um modelo de cultivo *in vitro*, no qual os ovários dos animais foram cultivados em concentrações crescentes de B[a]P como tratamento, por 24 h, 72 h ou 12 dias. Os autores relataram que houve uma redução no número de folículos morfologicamente normais na concentração de 1 µg/ml de B[a]P. LUDERER et al. (2020) corroboram esses achados em seu estudo realizado com fêmeas de ratos sendo expostas às crescentes concentrações de B[a]P (0, 10, 20 ou 40 mg/kg ao dia). Seu estudo mostrou que a exposição ao B[a]P nas concentrações de 10 mg/kg, 20 mg/kg, 40 mg/kg, reduziram a quantidade de folículos ovarianos morfologicamente normais em todos os estágios (primordiais, primários, secundários e antrais). Por sua vez, SADEU et al. (2011) utilizou folículos isolados mecanicamente de camundongos fêmeas para testar a exposição do condensado da fumaça de cigarro no desenvolvimento e funcionamento folicular. Os resultados indicaram um atraso no desenvolvimento folicular de folículos primordiais e em crescimento, além de terem observado atresia folicular em todos os estágios. LEE et al. (2017) expuseram ratas à fumaça de cigarro via oral, durante 2 horas por dia ao longo de 4 semanas. Seus resultados mostraram que a fumaça de cigarro impactou diretamente os folículos ovarianos, reduzindo significativamente as quantidades de folículos em crescimento. IGAWA et al. (2010) avaliaram a toxicidade do 7,12-dimetilbenzo[a]antraceno (DMBA), um potente carcinógeno que se encontra presente na fumaça de cigarro. O estudo, que utilizou cultivo *in*

vitro de tecido ovariano de ratos, comparou um grupo controle (DMSO) com diferentes concentrações de DMBA durante 15 dias. Foi relatado que o DMBA foi responsável pela perda de folículos primordiais e em crescimento. PAIXÃO et al. (2012) conduziram uma avaliação sobre os efeitos da exposição à fumaça de cigarro, constatando que o diâmetro oocitário em camundongos expostos ao fumo era significativamente menor em comparação aos ratos não fumantes. Esse estudo foi realizado durante 15 dias com camundongos sendo expostos de corpo inteiro, 8h por dia. Adicionalmente, o estudo revelou que as células da granulosa também sofreram impacto pela exposição, levando os autores a concluir que o cigarro interfere negativamente no desenvolvimento dos oócitos. Essa interferência pode ser atribuída à proliferação inadequada das células da granulosa, visto que, componentes presentes na fumaça de cigarro, como cádmio, exercem efeito significativo sobre as células da granulosa.

A similaridade observada entre as taxas de folículos morfolologicamente normais dos grupos controle (fresco e cultivado), comprovam a eficiência do cultivo *in vitro* utilizado no nosso estudo. O meio utilizado para o nosso experimento foi o α -MEM+. O meio α -MEM (Sigma M8042) possui em sua composição sais, minerais, aminoácidos, vitaminas e glicose. Adicionalmente foi acrescido outros nutrientes como glutamina, hipoxantina, BSA (albumina sérica bovina), ITS (insulina, transferrina, selênio), constituindo um meio extremamente rico em nutrientes e antioxidantes, já bem estabelecido em estudos anteriores na espécie caprina, e foi capaz manter a morfologia folicular até o fim do cultivo *in vitro* explicando a similaridade observada (FERREIRA et al., 2016).

No nosso estudo foram dosadas as espécies reativas de oxigênio (EROs) e a atividade da enzima catalase a fim de verificar se o dano à morfologia folicular pela exposição de EFC era devido ao estresse oxidativo. Entretanto, não foram observadas diferenças estatísticas entre a produção de EROs e atividade da catalase entre os tratamentos avaliados, demonstrando que provavelmente a redução no percentual de folículos morfolologicamente normais nos tratamentos EFC se deu por outros mecanismos. GANNON et al. (2013) avaliaram *in vivo* a exposição à fumaça de cigarro, duas vezes ao dia, de camundongos fêmeas durante 4, 8, 9 ou 17 semanas. Nesse estudo foi observada uma perda de folículos primordiais e uma redução em todos os estágios foliculares, assim como houve uma resposta de estresse oxidativo nos animais expostos à fumaça de cigarro. Apesar disso, a perda folicular não era mediada pela apoptose ou estresse oxidativo, em vez disso, foi associada à uma indução mediada por

autofagossomos nas células da granulosa, sugerindo que esse seja um mecanismo alternativo para a depleção da reserva folicular ovariana, sendo potencialmente ativado quando expostos a compostos tóxicos. Assim como em nossos resultados, WERZ et al. (2018) mostraram em seu estudo que a atividade enzimática da catalase foi reduzida após a exposição à fumaça de cigarro, isto porque a nicotina e a cotinina atua inativando especialmente enzimas antioxidantes como catalase, resultando em um acúmulo de H₂O₂ nas células, visto que a catalase não consegue desempenhar a sua função.

Com relação à categoria folicular, houve uma redução significativa de folículos primordiais em todos os tratamentos cultivados (α -MEM+, EFC: 2,5% e 5%) quando comparado com o controle fresco. Contudo, os grupos cultivados não apresentaram diferenças significativas entre si. A taxa de folículos em crescimento aumentou proporcionalmente à redução dos folículos primordiais apenas no tratamento α -MEM+, não sendo observado o mesmo nos tratamentos EFC: 2,5% e 5%. Acredita-se que houve ativação folicular em todos os tratamentos ao longo do cultivo *in vitro*, mas nos grupos EFC 2,5% e 5% houve degeneração dos folículos em crescimento, que podem ser mais susceptíveis aos componentes do cigarro. TUTTLE e colaboradores (2009) conduziram um estudo *in vivo* com camundongos fêmeas que buscavam avaliar o impacto da fumaça de cigarro em concentrações semelhantes às da exposição humana, sendo expostas à fumaça de dois cigarros diariamente, durante 8 semanas. Esse estudo revelou uma drástica redução do número de folículos, especialmente em estágio primordial, dos animais expostos à fumaça. No entanto, não foram observadas taxas maiores de morte apoptótica, levando os autores a concluir que, apesar da perda substancial de folículos, a apoptose não foi o principal mecanismo envolvido. SOBINOFF et al. (2013) conduziram um estudo *in vivo* utilizando camundongos fêmeas, que foram expostas à fumaça de cigarro via nasal duas vezes ao dia, durante 60 minutos, ao longo de 12 à 18 semanas. Os resultados mostraram uma diminuição significativa na população folicular, especialmente em folículos primordiais e primários, com uma redução de cerca de duas vezes na quantidade de folículos primordiais e três vezes na quantidade de folículos primários. Adicionalmente, observou-se um aumento na quantidade de folículos atresícos em decorrência da fumaça de cigarro. SOBINOFF et al. (2013) enfatiza que não foram detectadas taxas elevadas de apoptose em folículos primordiais, contrariando a suposição aceita na literatura de que a redução na reserva ovariana é resultado desse mecanismo, argumentando que a redução na reserva folicular ovariana não ocorre por meio da atresia folicular, e sim da alta taxa de recrutamento e substituição dos folículos primordiais por folículos em estágio de

desenvolvimento, pois, segundo ele, os agentes tóxicos possuem os folículos em desenvolvimento como alvo para destruição.

No presente estudo buscou-se avaliar se o extrato da fumaça de cigarro exerce efeito nas células do estroma ovariano, além das consequências já expostas anteriormente nas células foliculares. O estroma ovariano é composto por vasos sanguíneos, nervos, matriz extracelular e células estromais, estando presentes mais de uma população celular, sendo exemplo delas: fibroblastos, células fusiformes e células intersticiais. Não houve efeito na densidade dessas células em resposta à exposição à EFC, independente da concentração avaliada. Estudos anteriores avaliaram o impacto da fumaça de cigarro em monocultura de células epiteliais brônquicas sem fibroblastos (BR) e modelos de cocultura com fibroblastos (BRF). Foi observado que os modelos de cocultura com fibroblastos sofreram um impacto menor ao serem expostos à fumaça de cigarro, se comparado aos modelos sem fibroblastos, mostrando que os fibroblastos contribuem para uma maior capacidade de defesa contra o estresse oxidativo e os danos celulares causados a partir da exposição à fumaça de cigarro. Uma possível explicação proposta por ISKANDAR et al. (2015) é que a capacidade antioxidante dos fibroblastos podem ajudar a suprimir o estresse oxidativo induzido pela fumaça de cigarro. Provavelmente, em função da presença de fibroblastos, as células do estroma avaliadas no nosso estudo, apresentaram maior resistência do que células foliculares ovarianas, que parecem ser mais suscetíveis a fatores de estresse induzidos pela fumaça de cigarro. Embora o estroma tente oferecer proteção, os danos ainda podem ser significativos, resultando em morte celular.

9. CONCLUSÃO

O extrato da fumaça de cigarro reduz o percentual de folículos pré-antrais morfologicamente normais após 7 dias de cultivo *in vitro*. Neste estudo constatou-se que não foi possível determinar a via responsável pelas alterações na morfologia folicular, uma vez que o estresse oxidativo, que era a expectativa inicial, não se mostrou como um fator significativo. Dessa forma, mais estudos serão realizados para elucidar possíveis mecanismos envolvidos.

REFERÊNCIAS

AGENTES OXIDANTES E ANTIOXIDANTES. 2020.

ADONAAB, P. R. et al. **Ovogênese e Foliculogênese em Mamíferos.** 2013. Disponível em: <file:///C:/Users/Cliente/Downloads/admin,+Gerente+da+revista,+691-2665-1-CE.pdf>.

AGARWAL, A. et al. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. **Reproductive biology and endocrinology: RB&E**, v. 10, n. 1, p. 49, 2012.

AGOLAH, D. **Cumulus oophorus.** 2022.

ALVES, K., et al. “The Mare Model to Study the Effects of Ovarian Dynamics on Preantral Follicle Features.” **PLOS ONE**, vol. 11, no. 2, 22 Feb. 2016, p. e0149693, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149693>.

ANDERSON. AR et al. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by a component of cigarette smoke reduces germ cell proliferation in the human fetal ovary. 1ed, Molecular **Human Reproduction.** 2014.

ARAGÃO, J. A.; GUERRA, D. R. **APARELHO REPRODUTOR FEMININO.** 2012. Disponível em: <https://cesad.ufs.br/ORBI/public/uploadCatalogo/16233715102012Elementos_de_Anatomia_Humana_Aula_20.pdf>.

ARAÚJO, Valdevane Rocha, et al. “Qualitative and Quantitative Aspects of Atresia during Mammalian Folliculogenesis.” **Ciênc. Anim.** (Impr.), 2021, pp. 112–128, pesquisa.bvsalud.org/bvs-vet/resource/pt/biblio-1369123.

AUGUSTO, M. **ANATOMIA E FISIOLOGIA DO APARELHO REPRODUTOR DE FÊMEAS BOVINAS.** Disponível em: <http://www.faeef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/MBINAo2JHuZSrRY_2013-6-19-10-50-19.pdf>.

BARBOSA, KBF et al. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **COMMUNICATION.** Campinas, 1-15, 2010.

BATTISTON, F. G. **HOMEOSTASE GLICÊMICA EM RATAS COM PERDA DE FUNÇÃO OVARIANA E TRATADAS COM GLICOCORTICOIDE.** 2015. Disponível em: <<https://core.ac.uk/download/pdf/30412277.pdf>>.

BIANCHI, M. de L. P., & Antunes, L. M. G. (1999). Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, 12(2), 123–130. <https://doi.org/10.1590/s1415-52731999000200001>

BLACKBURN, C. W., Peterson, C. A., Hales, H. A., Carrell, D. T., Jones, K. P., Urry, R. L., & Peterson, C. M. (1994). Nicotine, but not cotinine, has a direct toxic effect on ovarian function in the immature gonadotropin-stimulated rat. **Reproductive Toxicology** (Elmsford, N.Y.), 8(4), 325–331. [https://doi.org/10.1016/0890-6238\(94\)90048-5](https://doi.org/10.1016/0890-6238(94)90048-5).

BRADFORD, M. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." **Analytical Biochemistry**, vol. 72, no. 1-2, 29 Jan. 1976, pp. 248–254, hoffman.cm.utexas.edu/courses/bradford_assay.pdf.

BROEKMANS, F. J.; SOULES, M. R.; FAUSER, B. C. Ovarian aging: Mechanisms and clinical consequences. **Endocrine reviews**, v. 30, n. 5, p. 465–493, 2009.

CAMLIN, NJ et al. Through smoke: use of in vivo and in vitro smoking models to elucidate its effect on female fertility. **Toxicology and Applied Pharmacology**. Vol. 283, 3 ed., 266-275p, 2014.

COSTA, FC. **Efeito da Aloe Vera no cultivo in vitro e criopreservação de folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano de bovinos**. 2020. 120p. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) - Universidade Federal do Ceará, Sobral.

CORTVRINDT, R., & Smitz, J. (2001). In vitro follicle growth: achievements in mammalian species. **Zuchthygiene [Reproduction in Domestic Animals]**, 36(1), 3–9. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2001.00261.x>

COSTA, FC et al. 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, 1 ed., 28-42p. 2022.

DE CÁSSIA ANTONINO, D. **Cultivo in vitro de folículos pré-antrais bovinos associado à nanopartículas e levitação magnética**. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/18853/1/CultivoInVitroFoliculos.pdf>>.

DE CASTRO, S. O. V. N. M. R. P. DE C. M. S. A. **Tabagismo, comorbidades e danos à saúde**. Disponível em: <<https://books.scielo.org/id/sj9xk/pdf/nunes-9788572166751-01.pdf>>.

DO NASCIMENTO JÚNIOR, B. J. **Anatomia humana sistemática básica**. [s.l: s.n.].

DRIANCOURT, M. A. (2001). Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, 55(6), 1211–1239. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00479-4](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00479-4)

EMBRAPA. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/48249>

FACIOLI, F. L. et al. A rare case of heteropaternal twin calves after natural mating in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 17, n. 4, p. e20200217, 2021.

FÉRIA, B. **Ovários**. KEN HUB. 2023.

FERNANDES, CF et al. Estresse oxidativo e mecanismo de defesa de plantas contra patógenos. **EMBRAPA**. 16p. 2013.

FREITAS, CS. **Introdução às Espécies Reativas de Oxigênio**. 2010.

FREOUR, T. et al. Active smoking compromises IVF outcome and affects ovarian reserve. **Reproductive biomedicine online**, v. 16, n. 1, p. 96–102, 2008.

GANNON, A. M., Stämpfli, M. R., & Foster, W. G. (2013). **Cigarette smoke exposure elicits increased autophagy and dysregulation of mitochondrial dynamics in Murine granulosa Cells**. *Biology of Reproduction*, 88(3). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.106617>

GASPAROTTO, L. G., Rosa, J. M., Grassini, P., & Marin, F. R. (2022). Developing an operational framework to diagnose yield gaps in commercial sugarcane mills. **Field Crops Research**, 278(108433), 108433. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2022.108433>

GELLNER, C. A.; REYNAGA, D. D.; LESLIE, F. M. Cigarette smoke extract: A preclinical model of tobacco dependence. et al [Current protocols in neuroscience], v. 77, p. 9.54.1-9.54.10, 2016.

GONÇALVES, J.; SOBRAL, M. **Cultivo de Células Da Teoria à Bancada**. João Pessoa: Editora UFPB, 2020.

GREEN, L. J., & Shikanov, A. (2016). In vitro culture methods of preantral follicles. **Theriogenology**, 86(1), 229–238. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.036>

GRIENDLING, K. K.; USHIO-FUKAI, M. Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. **Regulatory peptides**, v. 91, n. 1–3, p. 21–27, 2000.

GUPTA, M. D. et al. Biometry of female genital organs of Black Bengal goat. **International journal of natural sciences**, v. 1, n. 1, p. 12–16, 1970.

HALLIWELL, B. Oxidants and human disease: some new concepts. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 1, n. 5, p. 358–364, 1987.

HARRISON, D. G.; GONGORA, M. C. Oxidative stress and hypertension. *The Medical clinics of North America*, v. 93, n. 3, p. 621–635, 2009.

HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovary. Em: **International Review of Cytology**. [s.l.] Elsevier, 1991. p. 43–101.

HUNIADI, M. et al. Three-dimensional cultivation a valuable tool for modelling canine mammary gland tumour behaviour in vitro. **Cells** (Basel, Switzerland), v. 13, n. 8, p. 695, 2024.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. **Estatísticas de câncer**. Ministério da saúde. 2022.

IGAWA, Y., Keating, A. F., Rajapaksa, K. S., Sipes, I. G., & Hoyer, P. B. (2008). Evaluation of ovotoxicity induced by 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene and its 3,4-diol metabolite utilizing a rat in vitro ovarian culture system. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 234(3), 361–369. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.10.009>

ISKANDAR, A. R., Xiang, Y., Frentzel, S., Talikka, M., Leroy, P., Kuehn, D., Guedj, E., Martin, F., Mathis, C., Ivanov, N. V., Peitsch, M. C., & Hoeng, J. (2015). Impact assessment of

cigarette smoke exposure on organotypic bronchial epithelial tissue cultures: A comparison of mono-culture and coculture model containing fibroblasts. **Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology**, 147(1), 207–221. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv122>

JUAN, C. A. et al. The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: Outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 9, p. 4642, 2021.

JUNIOR, J. **CULTIVO IN SITU DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS DE CABRAS COM ESFINGOSINA 1- FOSFATO (S1P) E FATOR INIBIDOR DA LEUCEMIA (LIF)**. 2011. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, RS.

JUNQUEIRA, LC; CARNEIRO, J. **Histologia básica Texto & Atlas**. 13ed.,- [Reimpr.] Rio de Janeiro, 2018.

MARTINI et al. **Anatomia humana**. 6. ed. – Dados eletrônicos. – Porto Alegre : Artmed, 2009.

KANG, Q.; YANG, C. Oxidative stress and diabetic retinopathy: Molecular mechanisms, pathogenetic role and therapeutic implications. **Redox biology**, v. 37, n. 101799, p. 101799, 2020.

KERR, J., et al. “The Dynamics of the Primordial Follicle Reserve.” **Reproduction**, vol. 146, no. 6, 1 Dec. 2013, pp. R205–R215, rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/146/6/R205.xml, <https://doi.org/10.1530/REP-13-0181>.

KIM, C.-W. et al. Effects of cigarette smoke extracts on apoptosis and oxidative stress in two models of ovarian cancer in vitro. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 52, p. 161–169, 2018.

KINNEY, A., Kline, J., Kelly, A., Reuss, M. L., & Levin, B. (2007). **Smoking, alcohol and caffeine in relation to ovarian age during the reproductive years**. Human Reproduction (Oxford, England), 22(4), 1175–1185. <https://doi.org/10.1093/humrep/del496>

KLONOFF-COHEN, H. Female and male lifestyle habits and IVF: what is known and unknown. **Human reproduction update**, v. 11, n. 2, p. 179–203, 2005.

LEE, H.-M. et al. Cigarette smoke impaired maturation of ovarian follicles and normal growth of uterus inner wall of female wild-type and hypertensive rats. **Reproductive toxicology** (Elmsford, N.Y.), v. 73, p. 232–240, 2017a.

LEE, W. et al. The association between smoking or passive smoking and cardiovascular diseases using a Bayesian hierarchical model: based on the 2008-2013 Korea Community Health Survey. **Epidemiology and health**, v. 39, p. e2017026, 2017b.

LI, F. et al. Single-nucleus RNA Sequencing reveals the mechanism of cigarette smoke exposure on diminished ovarian reserve in mice. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 245, n. 114093, p. 114093, 2022.

LIANG, J. et al. Reactive oxygen species and ovarian diseases: Antioxidant strategies. **Redox biology**, v. 62, n. 102659, p. 102659, 2023.

LUDERER, U., Meier, M. J., Lawson, G. W., Beal, M. A., Yauk, C. L., & Marchetti, F. (2018). In utero exposure to Benzo[a]pyrene induces ovarian mutations at doses that deplete ovarian follicles in mice. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 60(5), 410–420. <https://doi.org/10.1002/em.22261>

MACHADO, L. P. et al. Lesão oxidativa eritrocitária e mecanismos antioxidantes de interesse na Medicina Veterinária. **REVISTA DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS**, 2009.

MHAMDI, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., & Noctor, G. (2010). Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. **Journal of Experimental Botany**, 61(15), 4197–4220. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq282>

MAI, Z., Lei, M., Yu, B., Du, H., & Liu, J. (2014). **The effects of cigarette smoke extract on ovulation, oocyte morphology and ovarian gene expression in mice.** *PloS One*, 9(4), e95945. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095945>

MAIA, Marciane. **Manejo Reprodutivo de Caprinos e Ovinos em Regiões Tropicais.** Embrapa Semiárido: Petrolina, PE, 2019. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/206551/1/Manejo-Reprodutivo-de-Caprinos-e-Ovinos-em-Regioes-Tropicais-2019.pdf>.

MACKLON, N. S.; FAUSER, B. C. J. M. Follicle-stimulating hormone and advanced follicle development in the human. **Archives of medical research**, v. 32, n. 6, p. 595–600, 2001.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4A, p. 609–614, 2002.

MARITIM, A. C., Sanders, R. A., & Watkins, J. B., III. (2003). Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, 17(1), 24–38. <https://doi.org/10.1002/jbt.10058>

MARTINS, FS. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Vol.32, 1 ed., 36-49p, 2008.

MCGEE, E. A. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocrine reviews**, v. 21, n. 2, p. 200–214, 2000.

MEDEIROS, J. P. et al. **ASPECTOS MORFOLÓGICOS DOS OVÁRIOS DE RATAS (RATTUS NOVERGICUS ALBINUS) TRATADAS COM IVERMECTINA.** *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 73, n. 2, p. 215–218, 2006.

MIHM, M.; GANGOOLY, S.; MUTTUKRISHNA, S. The normal menstrual cycle in women. **Animal reproduction science**, v. 124, n. 3–4, p. 229–236, 2011.

MORAES, I. **REPRODUÇÃO NAS FÊMEAS.** 2018.

MORTON, A. J. et al. Review: Roles of follicle-stimulating hormone in preantral folliculogenesis of domestic animals: what can we learn from model species and where do we go from here? **Animal: an international journal of animal bioscience**, v. 17, n. 100743, p. 100743, 2023.

MOURA, MF. **Estudo morfológico do complexo Cumulus Oophorus ovinos obtidos de folículos antrais em diferentes fases do ciclo estral e da gestação**. 2014. 41p. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Garanhuns, 2014.

Mortalidade no Brasil. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/gestor-e-profissional-de-saude/observatorio-da-politica-nacional-de-controle-do-tabaco/dados-e-numeros-do-tabagismo/mortalidade-no-brasil>>.

NANDI, A., Yan, L.-J., Jana, C. K., & Das, N. (2019). Role of catalase in oxidative stress- and age-associated degenerative diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2019, 9613090. <https://doi.org/10.1155/2019/9613090>

NEALE, J.; ALLEN, D.; COOMBES, L. Qualitative research methods within the addictions. **Addiction (Abingdon, England)**, v. 100, n. 11, p. 1584–1593, 2005.

PAIXÃO, L. L. O., Gaspar-Reis, R. P., Gonzalez, G. P. L., Santos, A. S., Santana, A. C., Santos, R. M. M., Spritzer, P. M., & Nascimento-Saba, C. C. A. (2012). Cigarette smoke impairs granulosa cell proliferation and oocyte growth after exposure cessation in young Swiss mice: an experimental study. **Journal of Ovarian Research**, 5(1), 25. <https://doi.org/10.1186/1757-2215-5-25>

PANTA, A. M. T. et al. Evaluation of in vitro culture systems for goat preantral follicles using reused ovaries from reproductive biotechniques: An alternative to maximize the potential of reproduction. **Zuchthygiene [Reproduction in domestic animals]**, v. 54, n. 3, p. 480–485, 2018.

PRASAD, C. V. B., Kodliwadmth, M. V., & Kodliwadmth, G. B. (2007). Erythrocyte superoxide dismutase, catalase activities and hydrogen peroxide induced lipid peroxidation in leprosy. **Leprosy Review**, 78(4), 391–397. <https://doi.org/10.47276/lr.78.4.391>

RAUSCH, M. et al. Organoid models and next-generation sequencing for bone marrow and related disorders. **Organoids**, v. 2, n. 3, p. 123–139, 2023.

Reprodução Animal 7a Edição HAFEZ. Disponível em: <<https://epage.pub/doc/reproducao-animal-7a-edicao-hafez-3m0dnmmpky>>.

REYNAUD, K. Alterations in ovarian function of mice with reduced amounts of KIT receptor. **Reproduction**, v. 121, n. 2, p. 229–237, 2001.

RENDI, M. H. et al. Female Reproductive System. **Comparative Anatomy and Histology A mouse and Human Atlas**, 2012. cap. 17, p.253-294.

RIBEIRO, J. **TABAGISMO E INFERTILIDADE: entenda.**

ROGRIGUES, A. et al. "Advances in Ovarian Tissue Cryopreservation in Goats and Sheep." **Acta Veterinaria Brasilica**, vol. 8, no. supl.2, 2 June 2014, <https://doi.org/10.21708/avb.2014.8.0.3941>. Accessed 13 May 2022.

SADEU, J. C.; FOSTER, W. G. The cigarette smoke constituent benzo[a]pyrene disrupts metabolic enzyme, and apoptosis pathway member gene expression in ovarian follicles. **Reproductive toxicology** (Elmsford, N.Y.), v. 40, p. 52–59, 2013.

SCHNEIDER, C.; OLIVEIRA, A. "Oxygen Free Radicals and Exercise: Mechanisms of Synthesis and Adaptation to the Physical Training *." **Rev Bras Med Esporte**, vol. 10, 2004, www.scielo.br/j/rbme/a/wwCFLrKpJhzX8fyYQG7zw5b/?format=pdf&lang=en.

SIDDIQUE, S. et al. In vitro exposure to cigarette smoke induces oxidative stress in follicular cells of F₁ hybrid mice: Cigarette smoke and oxidative stress in follicular cells. **Journal of applied toxicology: JAT**, v. 34, n. 2, p. 224–226, 2014.

SILVA, F., et al. "CmyoSize: An ImageJ Macro for Automated Analysis of Cardiomyocyte Size in Images of Routine Histology Staining." **Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger**, vol. 241, Apr. 2022, p. 151892, pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35091059/, <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2022.151892>.

SILVA, J. R. V. **ESTUDO DO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR INICIAL E ATRESIA EM OVÁRIOS CAPRINOS**. [s.l.] Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza, 2004.

SOBINOFF, A. P. et al. Jumping the gun: smoking constituent BaP causes premature primordial follicle activation and impairs oocyte fusibility through oxidative stress. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 260, n. 1, p. 70–80, 2012.

SOBINOFF, A. P. et al. Scrambled and fried: Cigarette smoke exposure causes antral follicle destruction and oocyte dysfunction through oxidative stress. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 271, n. 2, p. 156–167, 2013.

STEFANSODOTTIR, A. et al. In vitro exposure to benzo[a]pyrene damages the developing mouse ovary. **Reproduction & fertility**, v. 4, n. 2, 2023.

SUN, Y. et al. ROS systems are a new integrated network for sensing homeostasis and alarming stresses in organelle metabolic processes. **Redox biology**, v. 37, n. 101696, p. 101696, 2020.

TEIXEIRA, A. L. et al. **Influence of different phases of menstrual cycle on flexibility of young women**. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbme/a/CwDJHts6hKJwFR9XZRMJjdJ/?format=pdf&lang=en>.

TELFER, E. E. In vitro models for oocyte development. **Theriogenology**, v. 49, n. 2, p. 451–460, 1998.

TELFER, E. E., McLaughlin, M., Ding, C., & Thong, K. J. (2008). A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. **Human Reproduction** (Oxford, England), 23(5), 1151–1158. <https://doi.org/10.1093/humrep/den070>

TERRA, V. A. et al. Time-dependent reactive species formation and oxidative stress damage in the skin after UVB irradiation. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, v. 109, p. 34–41, 2012.

TUTTLE, A. M.; STÄMPFLI, M.; FOSTER, W. G. Cigarette smoke causes follicle loss in mice ovaries at concentrations representative of human exposure. *Human reproduction (Oxford, England)*, v. 24, n. 6, p. 1452–1459, 2009.

VASCONCELOS, T. B., Cardoso, A. R. N., Josino, J. B., Macena, R. H. M., & Bastos, V. P. D. ([s.d.]). Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo? Antioxidants and Free Radicals: Peril or Protection? Ufc.br.
https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/10133/1/2014_art_vpdbastos.pdf

VANNUCCHI, H., Moreira, E. A. M., da Cunha, D. F., Junqueira-Franco, M. V. M., Bernardes, M. M., & Jordão-Jr, A. A. ([s.d.]). PAPEL DOS NUTRIENTES NA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E NO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE. Usp.br.
https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/5782490/mod_resource/content/1/Papel%20Nutrientes%20Peroxidacao%20Lipidica.pdf

WILLIAMS, C. J.; ERICKSON, G. F. Morphology and physiology of the ovary. 2012.

WERZ R. H., Ehnert, S., Heid, D., Zhu, S., Chen, T., Braun, B., Sreekumar, V., Arnscheidt, C., & Nussler, A. K. (2018). Nicotine and cotinine inhibit catalase and glutathione reductase activity contributing to the impaired osteogenesis of SCP-1 cells exposed to cigarette smoke. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 3172480.
<https://doi.org/10.1155/2018/3172480>

ZHAN, S., Zhang, X., Cao, S., & Huang, J. (2015). **Benzo(a)pyrene disrupts mouse preimplantation embryo development.** *Fertility and Sterility*, 103(3), 815–825.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.11.013>

ZHUO, L.; KIMATA, K. Cumulus oophorus extracellular matrix: its construction and regulation. *Cell structure and function*, v. 26, n. 4, p. 189–196, 2001.