



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS
CURSO DE ZOOTECNIA

Fernanda Vitória de Oliveira Nogueira

Perfil redox em ovário caprino exposto ao extrato da fumaça de cigarro in vitro

MOSSORÓ

2024

Fernanda Vitória de Oliveira Nogueira

Perfil redox em ovário caprino exposto ao extrato da fumaça de cigarro in vitro

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

Orientadora: Profa. 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.

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas
da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

N778p Nogueira, Fernanda Vitória de Oliveira.
Perfil redox em ovário caprino exposto ao
extrato da fumaça de cigarro in vitro / Fernanda
Vitória de Oliveira Nogueira. - 2024.
52 f. : il.

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

1. fumaça de cigarro. 2. cultivo in vitro. 3.
caprino. 4. folículos. 5. estresse oxidativo. 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.

Fernanda Vitória de Oliveira Nogueira

Perfil redox em ovário caprino exposto ao extrato da fumaça de cigarro in vitro

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

Defendida em: ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Dr. Emanuel Kennedy Feitosa Lima (UFERSA)
Membro Examinador

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela força e sabedoria concedidas ao longo dessa caminhada. Nunca estive só.

À minha família, por todo incentivo e determinação em sempre priorizar minha educação, sem os quais eu não teria chegado até aqui. Especialmente minha mãe, Edinamá, por tudo que você abdicou por mim, e minha irmã, Monique, por ser também minha amiga.

À minha namorada, Clarissa. Seu apoio e confiança em mim foram essenciais durante todos os momentos. Sem a sua torcida nada disso seria possível. Obrigada pelo amor, carinho e companheirismo. Você é o meu maior presente.

Às minhas melhores amigas de vida, Luana, Marília e Júlia. Obrigada por toda paciência e acolhimento. Aprendi o significado da amizade com vocês.

Aos meus amigos, Dalton e Anny, por sempre me escutarem e me apoiarem. Até os momentos mais difíceis se tornam felizes com vocês.

À minha orientadora, prof^a. Dr^a. Gerlane Modesto da Silva, pela confiança depositada em mim, pelos conselhos e por todo o conhecimento compartilhado. Seu exemplo e experiência foram essenciais para a concretização deste trabalho.

Ao meu grupo de pesquisa, BioREP, composto por Eduarda, Fabrícia, Isadora, Raíssa, Rebeca e Victor, por toda ajuda. Cada um de vocês contribuiu de forma única para que eu pudesse concluir este projeto.

À prof^a. Dr^a Cibele dos Santos Borges e ao prof. Dr. Emanuel Kennedy Feitosa Lima por cederem seus laboratórios e por todo aprendizado, além de comporem a banca examinadora. Obrigada por todo tempo dedicado a esse trabalho.

Ao prof. Dr. Marcelo Barbosa Bezerra, por ceder seu laboratório e por todos os conselhos. É uma honra ter sido sua aluna.

RESUMO

As mulheres são mais afetadas do que os homens pelo efeito do tabaco e podem desenvolver câncer na cérvix e no ovário, menopausa precoce e redução da fertilidade. Mulheres fumantes têm a taxa de fertilidade reduzida de 75% para 57% devido aos efeitos tóxicos do tabaco que afetam diretamente o ovário. Estudos realizados *in vivo* e *in vitro* em ratas têm analisado esses efeitos nas células ovarianas, demonstrando que a exposição à fumaça de cigarro prejudica e inibe a maturação de folículos no ovário, além de induzir um crescimento anormal de células no útero e aumento no estresse oxidativo em folículos ovarianos, assim como afetar de forma negativa o desenvolvimento folicular e diminuir a sobrevivência folicular. Uma das possíveis causas desses fatores é o estresse oxidativo, caracterizado como um desequilíbrio da concentração das espécies reativas de oxigênio, perdendo a homeostase e desbalanceando as substâncias antioxidantes. A enzima catalase atua no sistema de defesa antioxidante natural do organismo, Já o malonaldeído é utilizado como biomarcadores de peroxidação lipídica resultante do aumento na produção de espécies reativas de oxigênio. O presente estudo buscou avaliar o perfil redox em ovário caprino exposto ao extrato da fumaça de cigarro *in vitro*. Foram utilizados ovários de cabras adultas, oriundas de abatedouro local. Os tratamentos foram divididos entre: controle (fresco e cultivado em meio α -MEM+) e Extrato da Fumaça do Cigarro (EFC 2,5% e 5%). Os meios foram coletados no D1 e D7, onde foram armazenados para serem utilizados nas análises de quantificação de proteínas totais (método de Bradford), determinação da produção de espécies reativas de oxigênio, avaliação da atividade da catalase e geração de malonaldeído (MDA). Todos os dados foram analisados utilizando o software estatístico GraphPad Prism. Os resultados foram expressos como média $\pm$ SEM e o teste utilizado para a análise estatística foi ANOVA (Análise de variância), seguido do teste de estatística descritiva. Os valores foram considerados significativos quando $P < 0,05$. Os resultados obtidos indicaram que não houve diferença estatisticamente significativa na produção de EROs, assim como na atividade da CAT e na produção de MDA, logo, não indicou aumento na peroxidação lipídica. Há uma deficiência no conhecimento dos exatos mecanismos que geram esse estresse oxidativo, assim como a definição das vias que são acionadas. Para isso, através da utilização de ovários caprinos, é possível simular esse processo de forma próxima da realidade em humanos, visto que essa espécie animal tem características similares de morfologia e foliculogênese quando comparado com as mulheres.

Palavras-chave: fumaça de cigarro; cultivo *in vitro*; caprino; folículos; estresse oxidativo

ABSTRACT

Women are more affected than men by the effects of tobacco and may develop cervical and ovarian cancer, early menopause, and reduced fertility. Smoking women have a reduced fertility rate, from 75% to 57%, due to the toxic effects of tobacco that directly impact the ovary. In vivo and in vitro studies conducted on female rats have analyzed these effects on ovarian cells, demonstrating that exposure to cigarette smoke impairs and inhibits follicle maturation in the ovary. It also induces abnormal cell growth in the uterus, increases oxidative stress in ovarian follicles, and negatively affects follicular development, reducing follicular survival. One possible cause of these effects is oxidative stress, characterized by an imbalance in reactive oxygen species concentrations, leading to disrupted homeostasis and an imbalance in antioxidant substances. The enzyme catalase plays a role in the body's natural antioxidant defense system, while malondialdehyde is used as a biomarker for lipid peroxidation resulting from increased reactive oxygen species production. This study aimed to evaluate the redox profile in goat ovaries exposed to cigarette smoke extract in vitro. Ovaries from adult goats obtained from a local slaughterhouse were used. The treatments were divided into: control (fresh and cultured in α -MEM+ medium) and Cigarette Smoke Extract (CSE 2.5% and 5%). The media were collected on D1 and D7 and stored for analyses of total protein quantification (Bradford method), determination of reactive oxygen species production, evaluation of catalase activity, and malondialdehyde generation. All data were analyzed using GraphPad Prism statistical software. Results were expressed as mean $\pm$ SEM, and ANOVA (Analysis of Variance) followed by descriptive statistics tests were used for statistical analysis. Values were considered significant when $P < 0.05$. The results indicated no statistically significant difference in ROS production, CAT activity, or MDA production, thus not indicating an increase in lipid peroxidation. There is a lack of knowledge regarding the exact mechanisms generating this oxidative stress, as well as the identification of the pathways triggered. Using goat ovaries, it is possible to simulate this process closely to the human reality, as this animal species has morphological and folliculogenesis characteristics similar to those of women.

Keywords: cigarette smoke; in vitro culture; goat; follicles; oxidative stress

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Órgãos internos do sistema reprodutor.....	14
Figura 2. Esquematização da ovogênese.....	16
Figura 3. Região medular e cortical do ovário.....	17
Figura 4. Curva de crescimento padrão de células em cultura.....	18
Figura 5. Representação esquemática dos sistemas de cultivo in vitro de folículos.....	19
Figura 6. Diferença entre o cultivo celular 2D tradicional e o cultivo 3D.....	20
Figura 7. Fontes de H ₂ O ₂ mitocondrial.....	23
Figura 8. Produto MDA - TBA.....	25
Figura 9. Produção de EROs.....	33
Figura 10. Atividade da CAT.....	35
Figura 11. Quantificação de MDA.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição das principais EROs.....	24
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina sérica bovina
CAT	Catalase
DMSO	Dimetilsulfóxido
EFC	Extrato da fumaça de cigarro
EROs	Espécies reativas de oxigênio
KOH	Hidróxido de potássio
MDA	Malonaldeído
NBT	Sal azul de nitrotetrazólio
PBS	Tampão fosfato
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. GESTÃO DO CONHECIMENTO (GC).....	18
2.1 Sistema reprodutor feminino.....	18
2.2 Cultivo in vitro.....	21
2.3 Extrato da fumaça de cigarro.....	23
2.3 Espécies reativas de oxigênio (EROs).....	23
2.4 Sistema de defesa antioxidante.....	26
3. JUSTIFICATIVA.....	29
4. HIPÓTESE.....	30
5. OBJETIVOS.....	31
5.1 Geral.....	31
5.2 Específicos.....	31
6. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
6.1 Coleta de ovários e cultivo in vitro.....	32
6.2 Proteínas totais (Métodos de Bradford).....	32
6.3 Espécies reativas de oxigênio (EROs).....	33
6.4 Catalase (CAT).....	33
6.5 Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	33
6.6 Análise estatística.....	34
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
7.1 Espécies reativas de oxigênio (EROs).....	40
7.2 Catalase (CAT).....	42
7.3 Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	43
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	46
REFERÊNCIAS.....	44

1. INTRODUÇÃO

Há 1,25 bilhão de adultos fumantes no mundo e, todos os anos, cerca de 8 milhões de pessoas morrem devido ao uso direto e 1,2 milhões morrem devido ao fumo passivo (OMS, 2024). De acordo com o Tobacco Atlas (2024), as mulheres são mais afetadas do que os homens pelo efeito do cigarro e podem desenvolver câncer na cérvix e no ovário, menopausa precoce e redução da fertilidade. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2010), mulheres fumantes têm a taxa de fertilidade reduzida de 75% para 57% devido aos efeitos tóxicos do tabaco que afetam diretamente o ovário. Estudos realizados in vivo têm analisado esses efeitos nas células ovarianas, como apresentado por Lee e colaboradores (2016), onde foram avaliados os tecidos do ovário e útero de ratas expostas à fumaça de cigarro in vivo, e os resultados demonstraram que a exposição à fumaça de cigarro prejudicou e inibiu a maturação de folículos no ovário, além de induzir um crescimento anormal de células no útero, apresentando um efeito adverso na funcionalidade dos órgãos reprodutivos de fêmeas. Resultados similares também foram observados no estudo feito por Gannon e colaboradores (2011), onde também foi observado o efeito da fumaça de cigarro in vivo em ratas, constatando que a exposição diminuiu o número de folículos, além de aumentar o estresse oxidativo e aumentar significativamente o número de autofagossomos em células da granulosa de folículos ovarianos.

Estresse oxidativo é um distúrbio metabólico no qual moléculas instáveis ocasionam injúrias celulares devido a reações de óxido-redução com moléculas orgânicas. Essas injúrias podem acarretar perda da função celular e, conseqüentemente, disfunções importantes nos sistemas orgânicos (CAMPOS & LEME, 2018). Isso ocorre na presença de altos níveis de espécies reativas do oxigênio (EROs), que são moléculas instáveis e extremamente reativas capazes de transformar outras moléculas com as quais colidem. As EROs são geradas em grande quantidade durante o estresse oxidativo, afetando diversas moléculas como proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos (SILVA & GONÇALVES, 2010). Alguns mecanismos são acionados como defesas antioxidantes naturais dos organismos, como as enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx) (BARBOSA et al. 2010). Dentre essas enzimas, a principal defesa do sistema antioxidante é a catalase, visto que ela desempenha papéis críticos na proteção das células contra os efeitos tóxicos do peróxido de hidrogênio (BAVARESCO, 2023). Já o malonaldeído (MDA) é

caracterizado como um marcador de peroxidação lipídica na membrana celular, por ser resultante do processo desse processo que é iniciado pela reação de um radical livre com um ácido graxo insaturado e propagado por radicais peroxilas (LIMA & ABDALLA, 2001).

O presente estudo se propõe a investigar o perfil redox em ovário caprino exposto ao extrato da fumaça de cigarro in vitro, a fim de avaliar se o estresse oxidativo é o mecanismo pelo qual há prejuízo na reprodução.

2. GESTÃO DO CONHECIMENTO (GC)

2.1 Sistema reprodutor feminino

O sistema reprodutor feminino (Figura 1) é composto por dois ovários (com peso variável de 0,5 a 3 gramas cada), infundíbulo (capta o óvulo após a ovulação e encaminha para o oviduto), ovidutos ou trompas (local onde ocorre a fecundação), útero (tipo bipartido, composto pelo corpo e dois cornos uterinos), colo do útero (apresenta anéis cervicais alinhados, sem obstrução), vagina (recebe o pênis durante a cópula e onde ocorre o depósito do sêmen) e vulva (porção mais externa) (FONSECA, 2005; EMBRAPA, 2019).

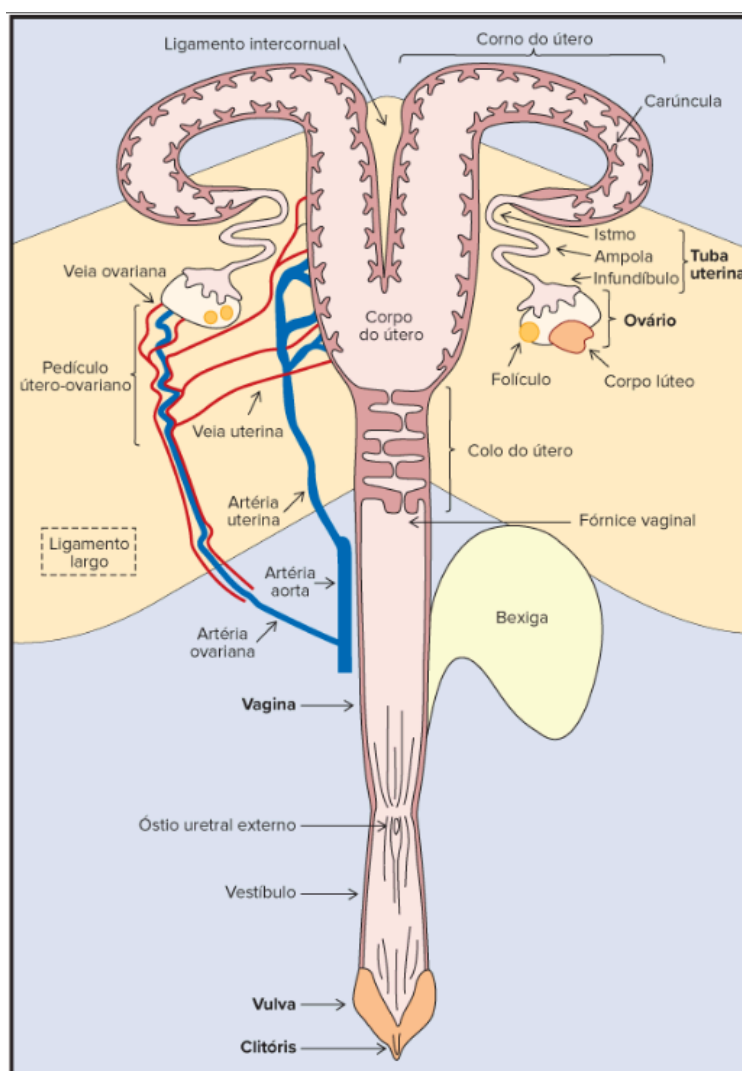


Figura 1. Órgãos internos do sistema reprodutor. **Fonte:** LUZ et al., 2023.

O ovário é dividido em duas regiões, sendo a parte interna denominada como região medular, responsável pela irrigação do tecido por possuir um tecido conjuntivo frouxo com um rico leito vascular; e a região cortical, sendo a parte mais externa constituída por tecido conjuntivo (estroma) e onde predominam os folículos ovarianos (Figura 3), que é o conjunto do ovócito e das células que o envolvem. Dentre as principais funções do ovário, estão: (1) produção de óvulos; (2) produção de hormônios sexuais femininos, como progesterona e estrógeno (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

A transformação das ovogônias em ovócitos maduros é definida como ovogênese (Figura 2). Essa série de eventos tem seu início ainda na vida intra-embriônica e somente chega ao seu fim após a puberdade. Pode-se dividir a ovogênese em três fases, sendo elas: multiplicação ou proliferação, crescimento e maturação. Na fase de multiplicação, as células germinativas primordiais ($2n$) migram para as gônadas femininas (ovário) e se multiplicam através de mitoses e geram as ovogônias ($2n$), que iniciam a primeira divisão meiótica e é pausada na prófase I, ficando em estado de suspensão. Já na fase de crescimento, ocorre um aumento citoplasmático e acúmulo de nutrientes das ovogônias. Ao final dessa fase, as ovogônias se transformam em ovócitos primários ($2n$) e se mantêm nesse estágio devido ao bloqueio da divisão meiótica, retomando seu desenvolvimento na puberdade. Por fim, a fase de maturação diz respeito a retomada da divisão, onde o ovócito primário completa a primeira divisão da meiose e gera duas células haplóides: o ovócito secundário e o primeiro corpúsculo polar, que se degenera instantaneamente. O ovócito secundário é responsável pela segunda divisão meiótica, que só irá ser finalizada em caso de fecundação, gerando o segundo corpúsculo polar, que também logo se degenera. Em caso de fecundação, é originado o zigoto. Com isso, a maturação do ovócito termina (ADONA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2009; PERSAUD & MOORE, 2008).

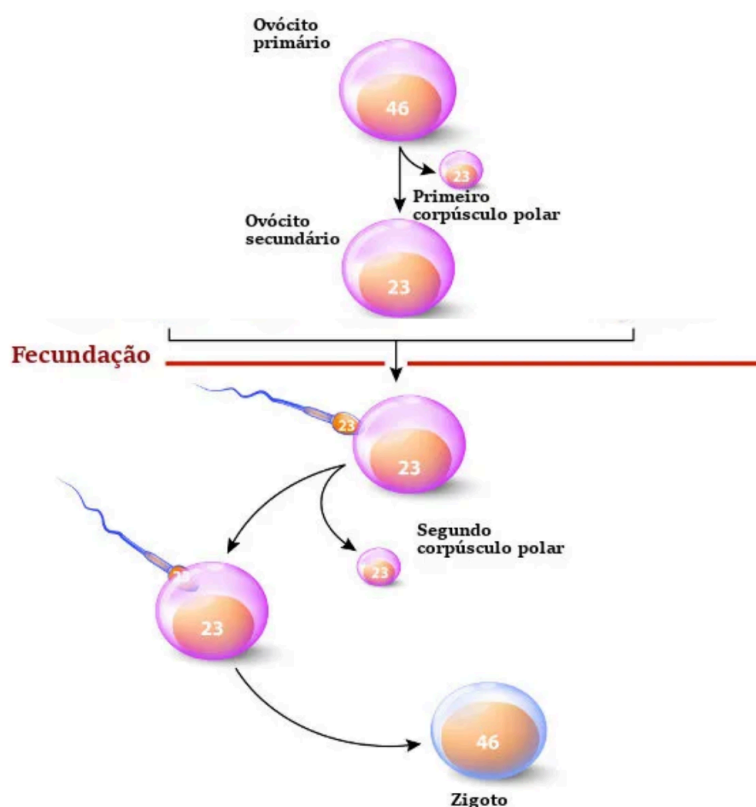


Figura 2. Esquematisação da ovogênese. **Fonte:** Adaptado de Santos, 2024.

Os folículos primordiais possuem um ovócito quiescente, ou seja, compõem o pool de reserva de células germinativas, se mantendo nesse estado por meses ou até anos (HIRSHFIELD, 1991). Esses folículos são caracterizados pela ausência de zona pelúcida e envolvidos por uma camada de células da granulosa pavimentosa. Na foliculogênese, quando ocorre a ativação (puberdade), esses folículos passam do pool de reserva para o pool de folículos em crescimento (RUSSE, 1983), processo este caracterizado pela proliferação da camada da granulosa. Sendo assim, os folículos primordiais passam a ser envolvidos por células da granulosa cúbicas e também pavimentosas, identificando assim os folículos em transição. Quando todas as células da granulosa obtêm o formato cúbico, esse folículo passa a ser identificado como primário (GOUGEON & BUSSO, 2000). A partir desse estágio é possível a visualização da zona pelúcida (WEZEL & RODGERS, 1996), composta por glicoproteínas e possuem diferentes funções, como: desenvolvimento do oócito, proteção durante o crescimento e transporte, fertilização, prevenção de polispermia, desenvolvimento do blastocisto e prevenção de implantação prematura (gravidez ectópica) (TOKUHIRO & DEAN, 2018) ou seja, essa estrutura acompanhará o ovócito nas fases seguintes. O folículo secundário é caracterizado pela presença de duas ou mais camadas de células da granulosa, e

pela formação de estruturas como: corona radiata, que compõe o conjunto de células que acompanham o ovócito na ovulação; e tecas foliculares, com uma camada interna e outra externa. Por fim, o folículo antral é determinado pelo aumento do líquido folicular acumulado entre as células, possuindo um antro folicular aparente e camadas da teca bem definidas, com a interna servindo para secreção de esteróides e a externa sendo fibrosa. Além disso, ocorre o surgimento do cummulus oophorus, que se inicia a partir da concentração de algumas células em um determinado local da parede do folículo que serve de apoio para o ovócito (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

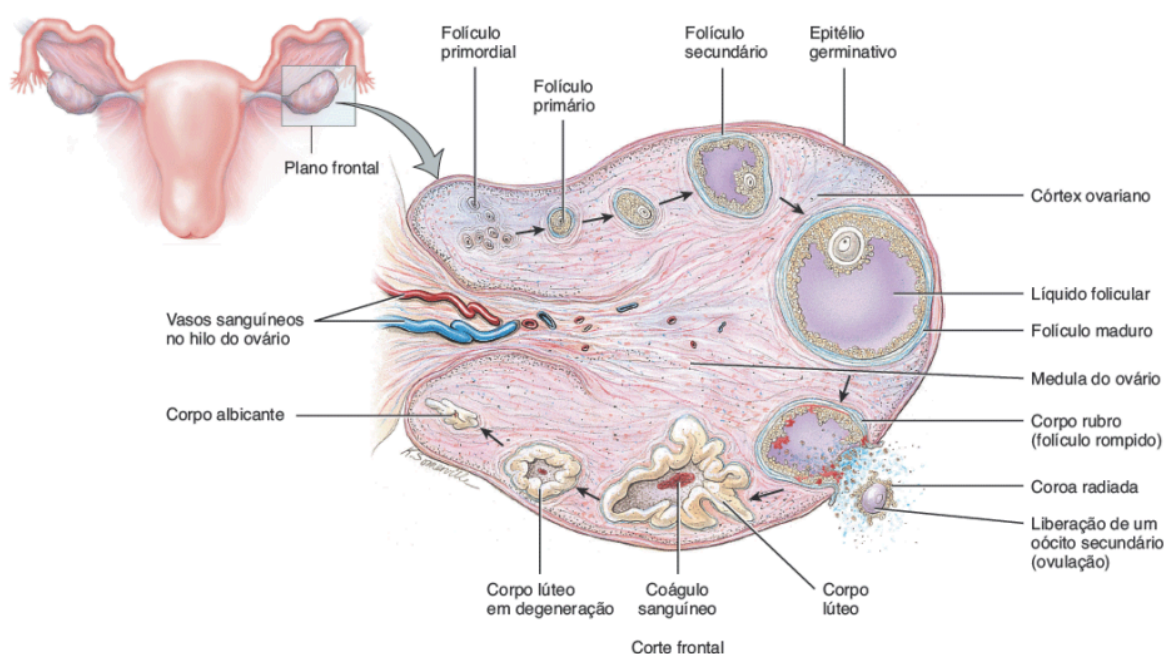


Figura 3. Região medular e cortical do ovário. **Fonte:** TORTORA & DERRICKSON, 2020.

O estudo da foliculogênese, bem como do efeito de diferentes substâncias neste processo, pode ser realizado através do cultivo in vitro.

2.2 Cultivo in vitro

O cultivo celular é uma técnica desenvolvida no início do século XX que possibilita o estudo do comportamento de células vivas fora do organismo, através do isolamento do tecido que é mantido em condições controladas de nutrientes, temperatura, pH e osmolaridade (BARBOSA et al., 2015), permitindo um avanço no conhecimento acerca das propriedades e

características dos tipos celulares em crescimento no laboratório (MOLINARO et al., 2010; GONÇALVES & SOBRAL, 2020).

Ao ser inserida no cultivo, as células passam por uma curva de crescimento (Figura 4). Iniciando com a fase de adaptação ao novo meio, definido como fase lag; seguido da fase de aumento exponencial, conhecido como fase log; passando para a fase de diminuição de atividade metabólica, sendo a fase estacionária; e, por fim, a fase de redução do número de células viáveis, que é a fase de declínio ou morte celular (PERES & CURI., 2005).

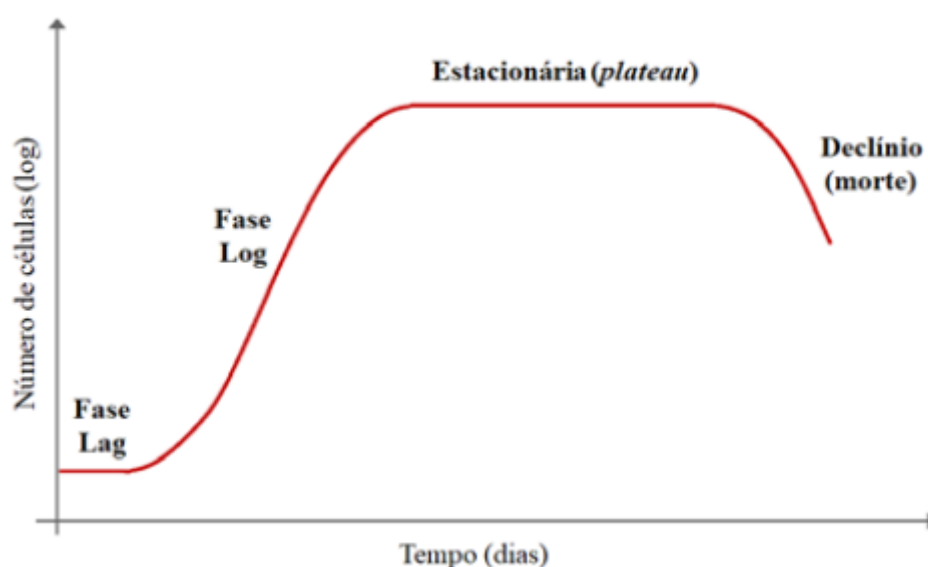


Figura 4. Curva de crescimento padrão de células em cultura. **Fonte:** GONÇALVES & SOBRAL, 2020.

O cultivo convencional trabalha com o crescimento das células em superfícies planas e sólidas onde, de acordo com a proliferação, são formadas monocamadas em formato bidimensional (2D) (Figura 6). As principais desvantagens desse método apontam a falta de uniformidade na distribuição dos nutrientes e do oxigênio dessas células no lado que está ancorado, não sendo fiel às condições in vivo. Diante desses apontamentos, foi desenvolvido um método que elimine a variável da ancoragem, transformando o modelo bidimensional em tridimensional (3D) (GONÇALVES & SOBRAL, 2020).

As principais vantagens do cultivo tridimensional, quando comparado com o bidimensional, são: proliferação, viabilidade, morfologia, diferenciação, comunicação célula-célula, migração e invasão de células cancerígenas em tecidos, expressão de genes e síntese de proteínas e relevância in vivo. Além disso, modelos tridimensionais podem ser

cultivados por até quatro semanas, diferentemente de apenas uma semana do cultivo bidimensional (SMITH, et al., 2012).

No cultivo *in vitro*, os ovários podem ser cultivados através de fragmentos de tecidos ou utilizando o ovário inteiro, caracterizado como *in situ*; e de forma isolada, através da retirada de todo o tecido do córtex ao redor do folículo, mantendo somente a estrutura (O'BRIEN et al., 2002). A técnica de cultivo *in situ* conserva o contato celular da célula com o tecido, promovendo interação intercelular entre folículos e células adjacentes como do estroma e da granulosa, mimetizando os mecanismos que ocorrem *in situ* (BIZARRO-SILVA & SENEDA, 2021). Na figura 5 pode-se observar a diferença entre o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos com a manutenção do tecido (A) e isolado (B).

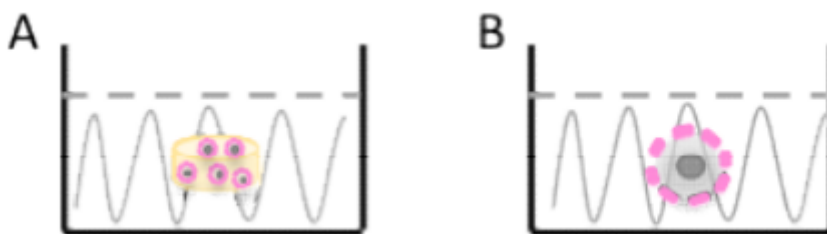


Figura 5. Representação esquemática dos sistemas de cultivo *in vitro* de folículos. (A) Cultivo *in vitro* de folículos envoltos em tecido ovariano (*in situ*). (B) Cultivo *in vitro* de folículos ovarianos isolados. **Fonte:** ADAPTADO DE BIZARRO-SILVA & SENEDA, 2021.

Diversas substâncias, como hormônios, fatores de crescimento e medicamentos, têm sido testados *in vitro* utilizando o cultivo *in situ* de tecido ovariano caprino. A escolha desse modelo animal é justificada em função das similaridades reprodutivas entre o ovário humano e o de fêmeas caprinas, sendo algumas delas: o processo de foliculogênese (PAULINI et al., 2014; LUCCI, et al., 2001) e o seu início ainda na vida fetal (BATTISTON, G. 2015; GRANADOS, et al. 2006); o tamanho e composição de do tecido (FRANSOLET, 2014); e a morfologia, onde o ovário de cabras possui o córtex e medula bem divididos, assim como em humanas (NASCIMENTO, B. 2020; RICARTE, et al. 2010).

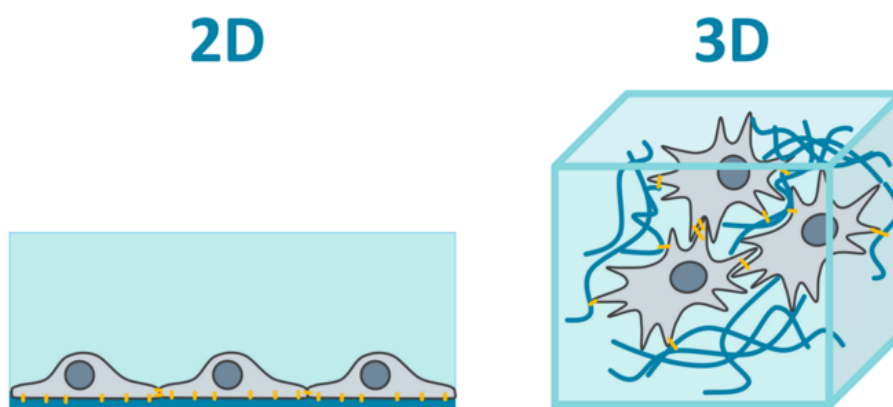


Figura 6. Diferença entre o cultivo celular 2D tradicional e o cultivo 3D; as células em 2D só podem formar ligações (amarelo) ao substrato (azul escuro) na parte inferior e tem apenas poucos contatos célula-célula; em cultivos 3D, as células podem formar ligações entre si e ao substrato em toda a superfície, como in vivo. **Fonte: KASPER et al., 2021.**

O estresse oxidativo no cultivo in vitro afeta o crescimento de células da granulosa, além de levar a apoptose e subsequente disfunção do oócito (SAEED-ZIDANE et al., 2017). A alta tensão de oxigênio durante o cultivo in vitro é um fator estressante que favorece modificações epigenéticas, como a metilação do DNA, promovendo alterações significativas na expressão de reguladores gênios pós-transcricionais (BOMFIM, 2017). Quando oócitos e embriões são retirados do seu ambiente natural para técnicas de reprodução assistida, o sistema de defesa natural é perdido. Sendo assim, para otimizar o desenvolvimento in vitro, o estresse oxidativo precisa ser controlado durante o cultivo (WANG et al., 2002).

Dentre as inúmeras substâncias que podem ser estudadas através do cultivo in vitro de tecido ovariano caprino, destaca-se o extrato da fumaça de cigarro.

2.3 Fumaça de cigarro

O tabagismo é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de várias doenças. Ao inalar a fumaça de cigarro, o organismo recebe elevadas quantidades de substâncias reativas de oxigênio, capazes de promover o estresse oxidativo (MARTINI, et al., 2010). Segundo um levantamento feito pelo Instituto do câncer de SP (2011), 1 em cada 4 mulheres com câncer de ovário relata consumo de álcool ou tabaco. Estudos em ratas sugerem que a exposição à fumaça de cigarro causa disfunção nos mecanismos de reparo das

mitocôndrias das células da granulosa, levando à autofagia e, conseqüentemente, perda folicular (GANNON et al., 2012).

Em estudos que expõem ratas à fumaça de cigarro in vivo, foi observado que a fumaça de cigarro causando um esgotamento na porcentagem de folículos primordiais, apoptose em folículos antrais e estresse oxidativo nos ovários, resultando na diminuição dos folículos disponíveis para ovulação. Mesmo em folículos que não foram degenerados, foi observado um aumento nos níveis de estresse oxidativo ao analisar os níveis de EROs e peroxidação lipídica (SOBINOFF et al., 2013).

2.4 Espécies reativas de oxigênio (EROs)

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas por organismos vivos como resultado do funcionamento normal do metabolismo. Porém, em níveis elevados, as EROs causam modificações adversas em componentes celulares, como lipídios, carboidratos, proteínas e DNA. O desbalanceamento entre oxidantes e antioxidantes com o aumento de oxidantes, é denominado desequilíbrio redox. Esse desequilíbrio pode causar a formação de compostos mutagênicos e o desencadeamento de processos inflamatórios e outras reações que estão diretamente ligados ao desenvolvimento de patologias como câncer, diabetes e doenças cardiovasculares (BIRBEN, et al., 2013; COMINETTI, et al., 2011; MENDES et al., 2020). EROs também influenciam o oócito, o espermatozóide, o embrião e o seu microambiente, participando inclusive do desenvolvimento e da maturação folicular, da ovulação e do funcionamento do corpo lúteo (ABREU et al., 2022). No ovário de camundongas são produzidas EROs durante a regressão luteal, participando no processo de ativação folicular e retomada espontânea da meiose em oócitos (LIMA-VERDE et al., 2007).

As EROs podem ser divididas em dois grupos: radicais livres e os compostos não radiculares. Moléculas contendo um ou mais elétrons desemparelhados e, portanto, dando reatividade à molécula, são classificadas como radicais livres. Dentre os radicais livres, os que possuem mais relevância fisiológica são os superóxidos (O_2^-) e radical hidroxila ($OH^\bullet$). Já no grupo dos não radicais, fazem parte o ácido hipocloroso, radical hidroperoxila e o mais relevante que é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), conforme descrito na Tabela 1 (BIRBEN, et al., 2013).

Tabela 1. Descrição das principais EROs.

Radical	Formação	Potencial
Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	Redução do O_2 com um elétron: $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$ (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999)	Reduzir o ferro iônico e seus complexos proteicos, podendo causar danos aos aminoácidos ou perda da função proteica (COMHAIR & ERZURUM, 2002)
Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	Redução de dois elétrons de oxigênio ou a dismutação do superóxido: $2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ (COMHAIR & ERZURUM, 2002)	Reage com metais de transição e participa de reações que produzem radical hidroxila (FENTON, 1894)
Radical hidroxila ($\bullet OH$)	Reação de Fenton: $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \bullet OH + OH^-$ Reação de Haber-Weiss: $O_2^{\bullet-} + Fe^{3+} \rightarrow O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \bullet OH + OH^-$ (ANDRADE JUNIOR et al. off., 2005)	Assim como as EROs anteriores, também causa danos ao DNA, RNA, às proteínas, lipídios e membranas celulares do núcleo e mitocondrial (BIRBEN, et al., 2013)

2.3.1 Fontes das EROs

As EROs podem ser classificadas de acordo com a sua fonte, sendo exógenas ou endógenas. De forma endógena, uma das principais células responsáveis pela formação dessas espécies são as mitocôndrias, responsáveis pela formação de superóxidos (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) durante as reações que ocorrem na cadeia de transporte de elétrons (Figura 7), especialmente nos complexos I (NADPH-ubiquinona oxidoreductase) e III (citocromo c redutase) (NETO, 2012). O superóxido gerado nesses complexos são rapidamente convertidos em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (O_2) pelas enzimas superóxido dismutase SOD1 e SOD2 no espaço intermembranar e na matriz mitocondrial, respectivamente. Enquanto o complexo I libera superóxido diretamente na matriz mitocondrial, o superóxido gerado pelo complexo III é predominantemente liberado no espaço intermembranar (ST-PIERRE et al., 2002).

Dentre os principais fatores exógenos que causam a formação de espécies reativas de oxigênio, está a fumaça de cigarro. A inalação da fumaça de cigarro até o pulmão ativa

mecanismos endógenos, como acumulação de neutrófilos e macrófagos, que futuramente aumentam o prejuízo causado pelo estresse oxidativo (BIRBEN, et al., 2013). Dentre os milhares compostos da fumaça de cigarro, estão espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que tem um potencial deletério sobre as moléculas (HU et al., 2007). A fumaça de cigarro contém grandes quantidades de substâncias formadoras de espécies reativas de oxigênio, como catecol e hidroquinona (ASAMI et al., 1997).

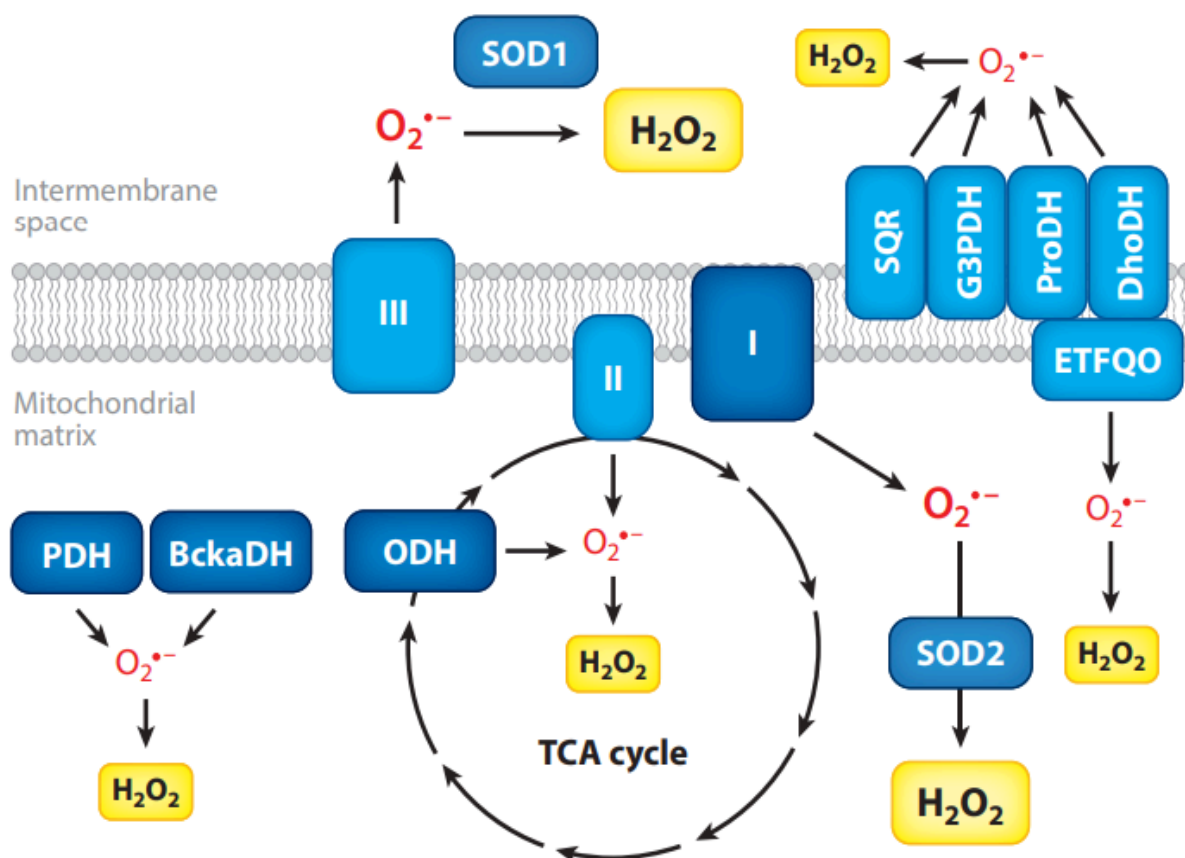


Figura 7. Fontes de H_2O_2 mitocondrial. Os complexos I, II e III produzem superóxido que é convertido em peróxido de hidrogênio pela SOD1 e SOD2. **Fonte:** SIES et al., 2017.

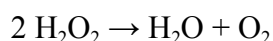
2.4 Sistema de defesa antioxidante

2.4.1 Enzimático

A catalase (CAT) é uma enzima do grupo de oxirredutases que oxidam substratos orgânicos e é um componente primário do sistema antioxidante endógeno. Essa enzima possui a capacidade de catalisar a decomposição do peróxido de hidrogênio em água (H_2O) e

oxigênio (O_2) (Equação 1) (BARREIROS et al., 2006; MENDES, et al., 2020). Sua atuação é mais ativa em altas concentrações de H_2O_2 , e é encontrada em quase todos os tecidos, principalmente em peroxissomas, local onde ocorre a catálise do peróxido de hidrogênio (TODOROVIC et al., 2016; ANDRADE JUNIOR et al., 2005).

Sua importância se dá pela sua ação de decomposição de uma das espécies reativas de oxigênio mais relevantes, o peróxido de hidrogênio, que em excesso causa oxidação da hemoglobina e, conseqüentemente, diminuição das concentrações de oxigênio, podendo desencadear infecções e necroses nos tecidos afetados (WIEACKER et al., 1980). Normalmente essa enzima é localizada na mitocôndria e peroxissomas, exceto nos eritrócitos, onde é encontrada no citosol (FERRO et al., 2010)



Outras enzimas compõem o sistema de defesa enzimático, como a superóxido dismutase (SOD), caracterizada como uma metaloenzima que catalisa a dismutação de dois radicais superóxido formando peróxido de hidrogênio e oxigênio. Sua distribuição é ampla no organismo. Semelhante à SOD, a glutathione peroxidase também compõe essa defesa, atuando na reação do peróxido de hidrogênio formando uma molécula de água. Essa enzima é mais ativa no fígado e eritrócitos (GUTIERREZ, 2002).

2.4.2 Não enzimático

O sistema de defesa não enzimático inclui, especialmente, os compostos antioxidantes de origem dietética, dentre os quais estão as vitaminas A (β -caroteno), C (ácido ascórbico) e E (α -tocoferol), além dos minerais cobre, zinco, magnésio e selênio, que são cofatores das enzimas antioxidantes. O β -caroteno atua na proteção contra a oxidação de lipídeos e DNA, já o ácido ascórbico além de inibir as EROs, também maximiza o poder antioxidante de outros compostos como a vitamina E e o selênio. Por fim, o α -tocoferol atua na proteção contra a peroxidação dos ácidos graxos insaturados da membrana celular, além de converter O_2 e H_2O_2 em formas menos reativas (RODRIGO et al., 2007; VINCENT et al., 2007; BARBOSA et al., 2010).

O ácido ascórbico é altamente relevante como antioxidante não enzimático, visto que é de fundamental importância para o organismo por ter participação em várias reações enzimáticas, além de atuar como potente antioxidante no fluido extracelular, protegendo o organismo de espécies reativas de oxigênio e também os lipídeos plasmáticos dos danos causados pelos radicais peróxidos na peroxidação lipídica (ARAÚJO et al., 2016).

2.4.3 Marcador de peroxidação lipídica

As espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) são utilizadas como um biomarcador de estresse oxidativo, especificamente de peroxidação lipídica da membrana celular (LIMA et al., 2015). A peroxidação lipídica (também chamada de lipoperoxidação) causa alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares, consequentemente, afetando a seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, além de formar compostos como o malonaldeído (MDA), resultando em morte celular. O processo ocorre em três etapas: iniciação, onde um radical livre ataca um ácido graxo insaturado, formando um radical lipídico; propagação, em que o radical lipídico reage com oxigênio, gerando hidroperóxidos; e terminação, quando antioxidantes neutralizam os radicais ou dois radicais se destroem (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Um dos produtos finais dessa reação é o malondialdeído, que reage com o TBA e formam um complexo de cor rosa que tem sua absorvância máxima em 532 - 535 nm (Figura 8), lido em espectrofotômetro para determinar a concentração (DRAPER & HADLEY, 1990; YAGI, 1987).

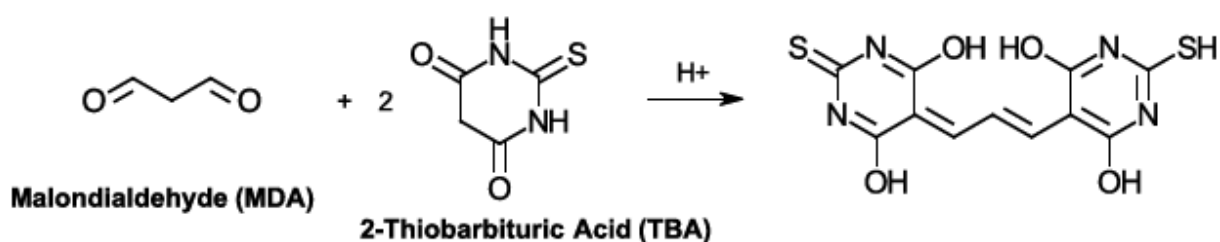


Figura 8. Produto MDA - TBA de cor rosa lido em espectrofotômetro no comprimento de onda 532 - 535 nm. **Fonte:** LEAC.

3. JUSTIFICATIVA

As mulheres são mais afetadas do que os homens pelo efeito do tabaco, principalmente no sistema reprodutor, como demonstrado por estudos em ratas in vivo que demonstraram que a exposição à fumaça de cigarro afetou a maturação de folículos no ovário, desencadeou um crescimento anormal de células no útero e aumentou o estresse oxidativo. E também em estudos em ratas in vitro, que obteve resultados semelhantes quanto a indução de estresse oxidativo em folículos ovarianos, além de afetar o desenvolvimento folicular e diminuir a sobrevivência. Segundo Neto (2008) e colaboradores, a dosagem dos níveis das atividades das enzimas antioxidantes e a quantificação de metabólitos de origem oxidativa podem servir para estimar o quadro de estresse oxidativo de diferentes sistemas celulares. Apesar dos inúmeros estudos apresentados, há uma deficiência no entendimento de como o estresse oxidativo afeta o ovário, assim como a definição das vias que são acionadas. Para isso, através da utilização de ovários caprinos, é possível simular esse processo de forma próxima da realidade em humanos, visto que essa espécie animal tem características similares de morfologia e foliculogênese quando comparado com as mulheres.

É de suma importância avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio em tecido ovariano de cabras, assim como analisar a atividade da catalase e a produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico que resulta no aumento da peroxidação lipídica. Diante disso, essa pesquisa tem como objetivo esclarecer as consequências da exposição da fumaça de cigarro em folículos ovarianos de cabras, contribuindo para uma melhor compreensão desses mecanismos.

4. HIPÓTESE

H0: O extrato da fumaça de cigarro não influencia na produção de espécies reativas de oxigênio em tecido ovariano caprino cultivado in vitro e não gera estresse oxidativo, assim como não altera a atividade da catalase e aumento da peroxidação lipídica.

H1: O extrato da fumaça de cigarro aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio em tecido ovariano caprino cultivado in vitro e altera a atividade da catalase, resultando em estresse oxidativo e aumento da peroxidação lipídica.

5. OBJETIVOS

5.1 Geral

- Avaliar o perfil redox em ovário caprino exposto ao extrato da fumaça de cigarro in vitro

5.2 Específicos

- Determinar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) após cultivo in vitro de tecido ovariano caprino em diferentes concentrações de extrato da fumaça de cigarro.
- Analisar o impacto da exposição de tecido ovariano caprino ao extrato da fumaça de cigarro na atividade da catalase (CAT).
- Avaliar o dano oxidativo em tecido ovariano caprino cultivado em diferentes concentrações de extrato da fumaça de cigarro.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Coleta de ovários e cultivo *in vitro*

Foram utilizados 8 ovários, provenientes de 4 cabras sem raça definida, oriundos de abatedouros locais. Imediatamente após o abate, os ovários foram coletados, lavados uma vez em álcool 70% e duas vezes em solução salina (0,9%), suplementados com 100 µg/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina e transportados ao laboratório em 30 minutos à temperatura de 4 °C. Foram obtidas 10 amostras de tecido (3 x 3 x 1 mm) de cada par ovariano usando uma agulha e um bisturi em 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 µg/mL, transferrina 6,25 µg/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. Os tratamentos foram divididos entre: controle (fresco e cultivado em meio α -MEM+) e Extrato da Fumaça do Cigarro (EFC 2,5% e 5%). Os meios foram coletados no D1 e D7, onde foram armazenados para serem utilizados nas análises a seguir:

6.2 Proteínas totais (Métodos de Bradford)

A quantificação das proteínas totais presentes nas amostras foi feita através do método de Bradford (BRADFORD, 1976). Essa técnica utiliza reagente de Bradford (RB) que tem como principal componente o corante Coomassie Brilliant Blue G-250 onde, em solução ácida, se liga nas proteínas e tem sua absorbância alterada de 465 nm para 595 nm. Essa interação estabiliza a forma aniônica do corante, causando uma visível mudança de coloração

inicialmente castanha para tons variados de azul, de acordo com a concentração de proteína. 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 feita a preparação da curva padrão, seguida pela diluição da BSA para uma concentração de 1 mg/mL utilizando água deionizada. Em seguida, a preparação das amostras foi realizada em placas de microtitulação, utilizando 1 µL de amostra e juntamente de 199 µL de solução de Bradford. Por fim, a leitura foi efetuada em um leitor de microplacas a um comprimento de onda de 595 nm.

6.3 Espécies reativas de oxigênio (EROs)

A análise feita foi adaptada de Choi e Col (2006) utilizando o método baseado na reação do sal azul de nitrotetrazólio (NBT) com as espécies reativas de oxigênio. Aproximadamente 90% desse sal faz reação exclusivamente com o ânion superóxido, e outras espécies reativas como radical hidroxila, peróxido de hidrogênio e o ácido hipocloroso. Foi adicionado 100 µL da amostra a cada eppendorf juntamente de 100 µL de NBT a 0,1% (dissolvido em PBS). Os eppendorfs foram incubados em estufa a 37°C por um período de 45 a 60 minutos. Após isso, adicionou-se 500 µL de PBS a cada eppendorf, seguido pela centrifugação a 2600 RPM por 10 minutos. Em seguida, utilizou-se 250 µL da solução no eppendorf juntamente de 250 µL da uma solução de KOH+DMSO (preparada com 5400 µL de KOH a 2 M e 6300 µL de DMSO, totalizando 11700 µL). 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.

6.4 Catalase (CAT)

A atividade da catalase foi analisada através do método descrito por Aebi, H (1984), no qual é observado o decaimento do peróxido de hidrogênio na absorbância de 240 nm. Os reagentes utilizados foram tampão fosfato (PBS) com pH em 7,4, juntamente do H₂O₂ (peróxido de hidrogênio). Ambos foram utilizados para formar o mix (4 mL de PBS para 64 µL de H₂O₂). Para a análise da amostra, foi utilizado 100 µL de amostra com 900 µL do mix,

lidos no tempo 0, 30 e 60 segundos no comprimento de onda 240 nm. Os resultados foram expressos em u/mg proteína.

6.5 Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Esse ensaio avalia o dano oxidativo através da geração de malondialdeído (MDA) usando o método descrito por Draper et al., 1993. A curva padrão foi feita com concentrações decrescentes de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) diluídas em água destilada. O preparo das amostras foi feito utilizando 100 µl da solução de ácido tricloroacético (TCA) 10% juntamente com 100 µl da amostra. Os eppendorfs foram centrifugados (5.800 rpm) durante 15 minutos. Em seguida, foi recolhido 150 µl do sobrenadante e adicionado 150 µl da solução de ácido tiobarbitúrico (TBA). Os eppendorfs foram levados para o banho seco (95 °C) durante 10 minutos, em seguida, foram deixados para esfriar em temperatura ambiente por 15 minutos e, na preparação da placa de 96 poços, foi adicionado 120 µl em cada poço em duplicata tanto da curva padrão quanto das amostras. A leitura foi feita em um leitor de microplacas em 532 nm. Os resultados foram expressos em nMol de MDA/mg de proteína.

6.6 Análise estatística

Todos os dados foram analisados utilizando o software estatístico GraphPad Prism. Os resultados foram expressos como média $\pm$ SEM e o teste utilizado para a análise estatística foi ANOVA (Análise de variância), seguido do teste de estatística descritiva. Os valores foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Espécies reativas de oxigênio (EROs)

Na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), não houve diferença significativa no D1 nos tratamentos α -MEM+, 2,5% e 5% do EFC e nem no D7 nos mesmos tratamentos.

No tratamento α -MEM+, no D1 obteve-se média de 83,9 ($\pm$ 10,21) e no D7 129,8 ($\pm$ 7,4). No tratamento de 2,5% EFC, no D1 a média foi de 84,6 ($\pm$ 17,6) e no D7 150,2 ($\pm$ 40,3). No tratamento 5% EFC, no D1 obteve-se média de 70,8 ($\pm$ 13,6) e no D7 111,0 ($\pm$ 23,4). Todos os resultados foram expressos em μ g formazan/ptn.

A síntese de EROS provenientes dos procedimentos do cultivo in vitro de oócitos e folículos ovarianos afetam de forma negativa a eficiência desta técnica. Porém, é possível contornar esses fatores com a adição de antioxidantes que formam uma proteção contra o estresse oxidativo, se tornando uma estratégia para otimizar o cultivo in vitro (COSTA, et al., 2022). O meio utilizado para o cultivo foi o meio essencial mínimo (α -MEM+), suplementado com insulina, transferrina, selênio, glutamina, hipoxantina e albumina sérica bovina (BSA) (GOMES, et al., 2015). A transferrina atua como antioxidante ao ajudar a reduzir níveis tóxicos de espécies reativas de oxigênio ao atuar como transportadora de ferro intracelular, assim como o selênio, que é um cofator da glutathione peroxidase, um agente antioxidante enzimático (MOKASHI & DASGUPTA, 2020; CASTRO & AMARAL, 2022). A glutathione também participa do sistema antioxidante, podendo influenciar a via de sinalização celular da expressão de proteínas de choque térmico (HSPs) que atuam na regulação do equilíbrio celular na presença de EROs (CRUZAT et al., 2009). Sendo assim, o meio utilizado juntamente com a suplementação podem ter contribuído para amenizar o estresse oxidativo das células, justificando assim os resultados não significativos obtidos. O meio utilizado no presente estudo foi o padrão para cultivo in vitro de folículos ovarianos de cabra, onde foi avaliado o meio sem a presença do EFC e com a presença nas concentrações de 2,5% e 5%. Para estudos futuros, recomenda-se a utilização do meio suplementado e o meio sem a suplementação, possibilitando que seja analisado se o estresse oxidativo não foi identificado devido ao meio utilizado ter inibido a produção de EROs.

Diferentemente dos resultados obtidos neste estudo, na pesquisa desenvolvida por Santos e colaboradores (2014), a fumaça de cigarro aumentou a produção de EROs no tecido

de coração em ratos Wistar, potencialmente aumentando o estresse oxidativo. Mesmo com estudos que apontam que o cultivo in vitro favorece o estresse oxidativo (CROCOMO et al., 2012), normalmente, são utilizados homens e mulheres fumantes e não fumantes ou, em caso de animais como ratos e camundongos, eles são expostos à fumaça de cigarro in vivo através do tempo de exposição ou número de cigarros utilizados, não definindo a concentração. No caso de estudos in vitro, como no estudo realizado por Siddique e colaboradores (2013), a concentração utilizada do extrato da fumaça de cigarro foi de 30 até 130 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$. Nesse mesmo estudo, avaliou-se a exposição in vitro de fumaça de cigarro induziu o estresse oxidativo em células foliculares de ratas híbridas. Através dos resultados, sugeriu-se que a exposição induziu o estresse oxidativo em folículos ovarianos, efeito esse que pode contribuir para atenuar os mecanismos adjacentes do desenvolvimento do folículo. Resultados similares foram encontrados no estudo feito por Sadeu e Foster (2010), onde foi avaliado o efeito da exposição in vitro ao benzopireno, um componente da fumaça de cigarro, na foliculogênese, esteroidogênese e na maturação do oócito em ratas. De acordo com os resultados obtidos, esse componente afeta de forma negativa o desenvolvimento folicular, além de diminuir a sobrevivência folicular.

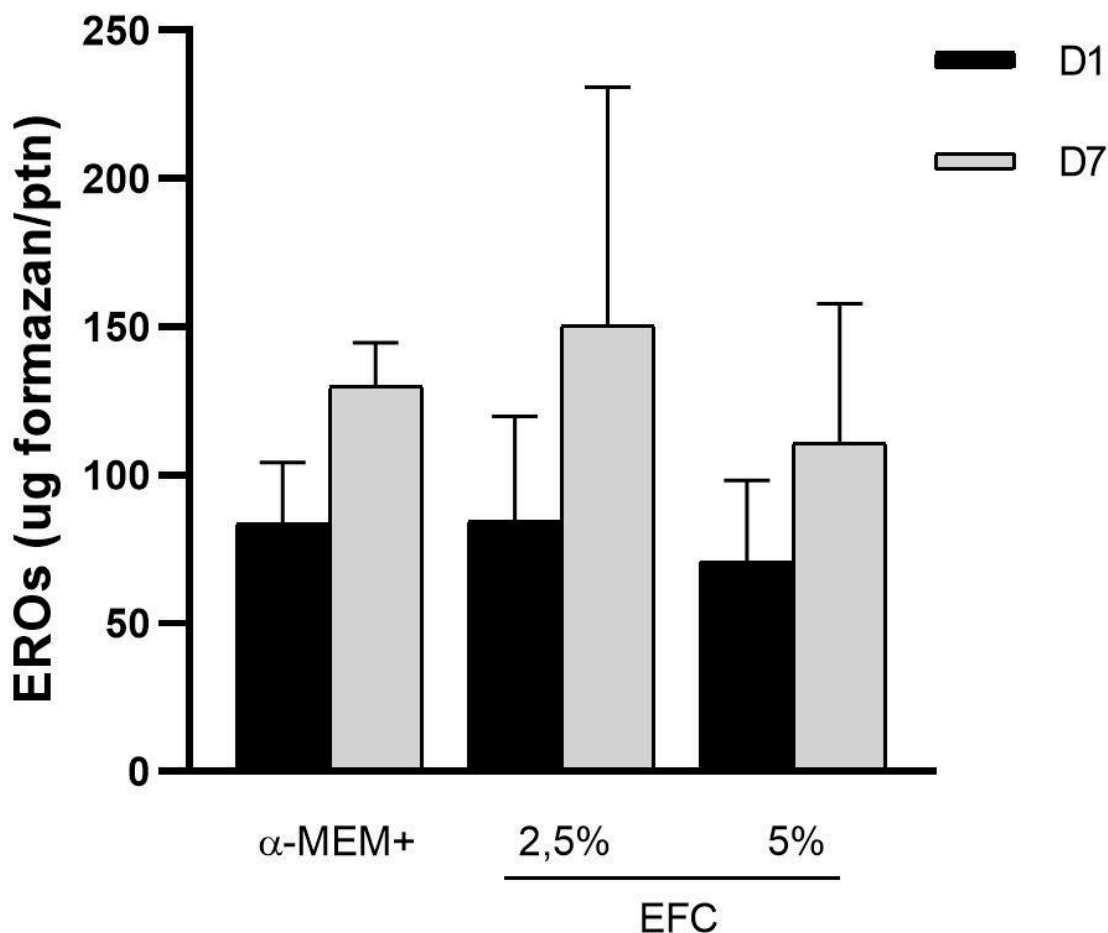


Figura 9. Produção de EROs após 1 ou 7 dias de cultivo in vitro de tecido ovariano caprino exposto a diferentes concentrações do efc. ($P>0,05$; Média $\pm$ SEM).

7.2 Catalase (CAT)

Na análise da atividade da catalase, não houve diferença significativa no D1 nos tratamentos α -MEM+, 2,5% e 5% do EFC e nem no D7 nos mesmos tratamentos.

No tratamento α -MEM+, no D1 obteve-se média 2,4 ($\pm$ 0,8) e no D7 4,3 ($\pm$ 2,7). No tratamento 2,5%, no D1 obteve-se média 3,0 ($\pm$ 2,3) e no D7 1,5 ($\pm$ 0,3). No tratamento 5%, no D1 obteve-se média 1,6 ($\pm$ 0,6) e no D7 4,0 ($\pm$ 1,1). Todos os resultados foram expressos em U/mg ptn.

Outros estudos, como Kocyigit e colaboradores (2001), corroboram a não alteração na atividade da CAT entre grupos de fumantes e não fumantes, mas apresentam resultados significativos para a alteração do teor de cobre, zinco, ferro e tiocianato no sangue, indicando possivelmente que a alteração das enzimas antioxidantes são secundárias, diante das

alterações das concentrações dos seus cofatores. Outras enzimas antioxidantes também são avaliadas, como no estudo feito por Bolzán e colaboradores (1997) que analisou a atividade das enzimas CAT, SOD (superóxido dismutase) e GSH-Px (glutathione peroxidase). Porém, também não foi observada influência da fumaça de cigarro na atividade dessas enzimas. Como essa análise foi feita diretamente no sangue de homens fumantes e não fumantes, não foi determinada a concentração da carga de tabagismo.

No estudo desenvolvido por Santos e colaboradores (2014), observou-se que a exposição à fumaça de cigarro não alterou a atividade da catalase em ratos Wistar. Porém, com o exercício físico a atividade dessa enzima foi elevado, e em ratos que foram expostos à fumaça de cigarro esse aumento foi revertido, sendo assim, a exposição à fumaça de cigarro minimiza a capacidade enzimática da CAT em ratos fumantes que fizeram exercício físico. Visto que não há um consenso na literatura sobre a alteração ou não da atividade enzimática da catalase após a exposição à fumaça de cigarro, se fazem necessários mais estudos aprofundados a respeito desse tópico.

No presente estudo, há a possibilidade de que não tenha ocorrido produção de EROs caso os folículos que foram expostos às concentrações de 2,5% e 5% de EFC tenham sofrido apoptose, logo, com a morte celular da célula não houve a produção de EROs.

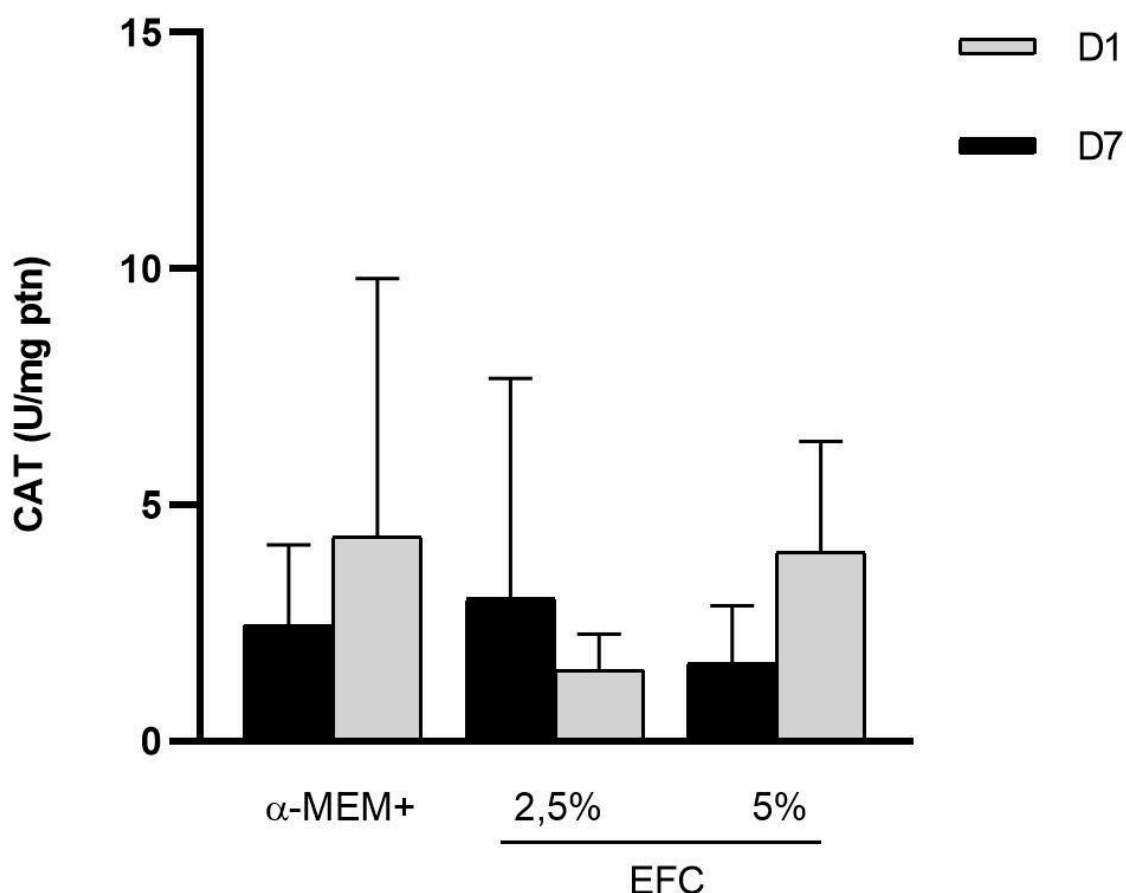


Figura 10. Atividade da CAT após 1 ou 7 dias de cultivo in vitro de tecido ovariano caprino exposto a diferentes concentrações do efc. ($P>0,05$; Média $\pm$ SEM).

7.3 Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Na quantificação do malondialdeído (MDA) (Gráfico 3), não houve diferença significativa no D1 nos tratamentos α -MEM+, 2,5% e 5% do EFC e nem no D7 nos mesmos tratamentos.

No tratamento α -MEM+, no D1 obteve-se média 676,8 ($\pm$ 105,9) e no D7 1.077 ($\pm$ 62,1). No tratamento 2,5%, no D1 obteve-se média 719,5 ($\pm$ 181,7) e no D7 1.210 ($\pm$ 318,1). No tratamento 5%, no D1 obteve-se média 663,1 ($\pm$ 116,3) e no D7 876,8 ($\pm$ 259,9). Todos os resultados foram expressos em MDA/mg ptn.

Um estudo prévio (MARTINI, et al., 2010) apresentou resultados semelhantes no tecido do fígado e pulmão de camundongos expostos à fumaça de cigarro, onde também não houve diferença estatística quando comparado com o grupo não exposto na quantidade de

MDA. Porém, nesse mesmo estudo, a produção de MDA teve uma elevação significativa no tecido do cérebro exposto ao EFC, indicando possivelmente que tecidos específicos, como o cérebro, são alvos potenciais das espécies reativas, não influenciando em outros tecidos como fígado e pulmão.

De acordo com Torres (2009), ao avaliar os efeitos da inalação da fumaça de cigarro no estresse oxidativo do sistema nervoso de camundongos jovens, somente no grupo agudo (única exposição de 1h com eutanásia imediata) houve um aumento de MDA, quando comparado com grupos de exposição diária por 13 e 35 dias, que não teve aumento significativo, sugerindo assim uma resposta tardia do córtex frontal e uma possível adaptação dos tecidos testados. Nesse mesmo estudo, é observado que a enzima antioxidante GST é a primeira a ser afetada pela exposição à fumaça de cigarro, indicando que, possivelmente, a ativação da GST impede a produção de MDA algumas horas após a exposição e também durante a exposição diária. É ressaltado também que o MDA é rapidamente metabolizado pelo tecido de mamíferos, podendo superestimar o resultado final da análise.

A medição dos níveis de MDA como indicador de peroxidação lipídica consequente da exposição à fumaça de cigarro também é estudada em reprodutores, como no estudo desenvolvido por Maestra e colaboradores (2014), onde foi avaliado o efeito da exposição à fumaça de cigarro in vivo na morfologia dos testículos e espermatozóides de ratos. Apesar de não ter influenciado no tecido do testículo, a fumaça de cigarro aumentou a peroxidação lipídica nos espermatozóides, onde também aumentou a geração de EROs, indicando o estresse oxidativo. Resultados semelhantes também foram encontrados em humanos. No estudo desenvolvido por Ghaffari & Rostami (2011), foi analisado o nível de peroxidação lipídica em espermatozóides de homens fumantes e a relação com a mobilidade espermática. Os resultados indicaram que os a fumaça de cigarro podem afetar a mobilidade do espermatozóide ao aumentar a peroxidação lipídica, indicando também a possibilidade de que a geração de MDA possa ser um dos fatores causadores da infertilidade masculina.

Diante dos resultados expostos e comparados com a literatura, não é possível concluir que a exposição à fumaça de cigarro altera a produção do composto MDA. Se fazem necessários mais estudos aprofundados para melhor entendimento.

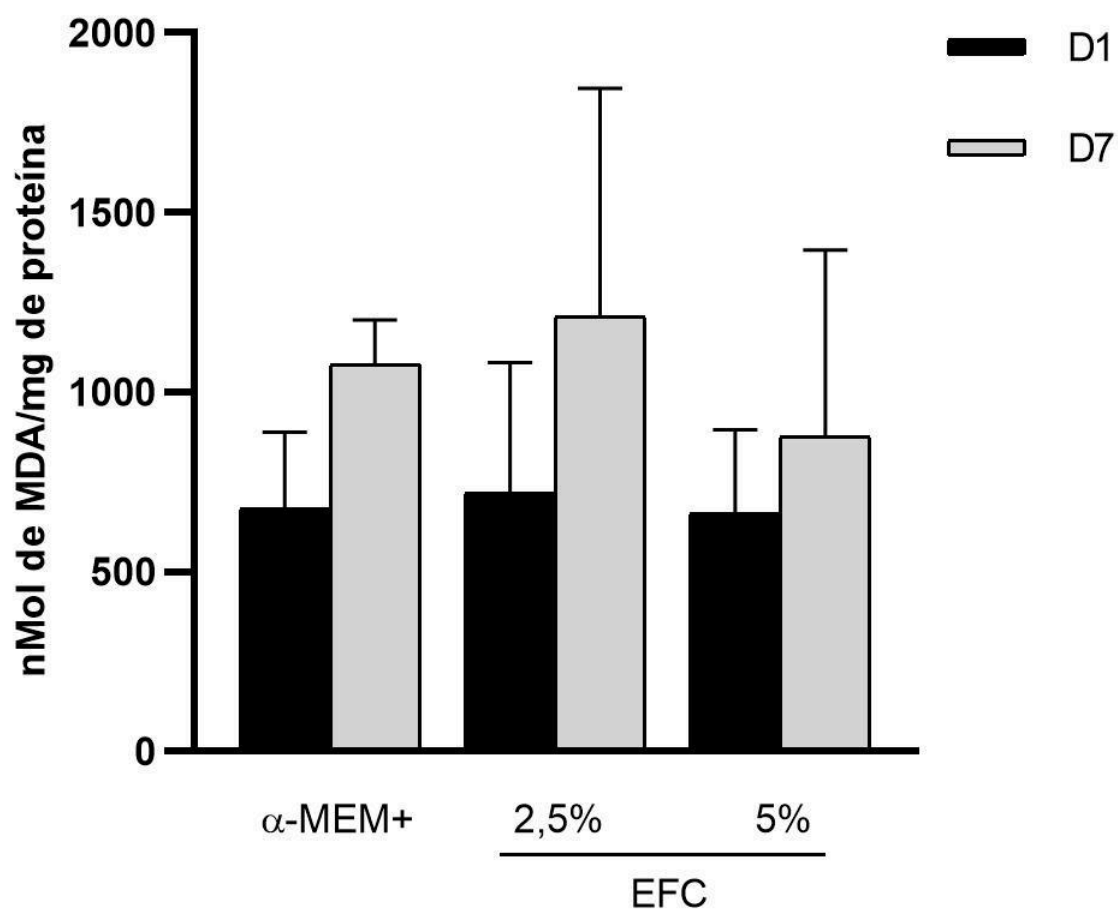


Figura 11. Quantificação de MDA após 1 ou 7 dias de cultivo in vitro de tecido ovariano caprino exposto a diferentes concentrações do efc. ($P > 0,05$; Média $\pm$ SEM).

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados expostos, a exposição ao extrato da fumaça de cigarro não resultou em produção significativa de espécies reativas de oxigênio, além de não alterar a atividade da catalase e não influenciar no aumento na produção de malonaldeído, consequentemente, não indicando peroxidação lipídica. Com isso, as perspectivas futuras são de realizar mais estudos para melhor compreensão do perfil redox em tecido ovariano caprino exposto ao EFC.

REFERÊNCIAS

- ABREU, Juliana Maganha *et al.* **Variações oxidativas e histológicas dos ovários de camundongas LDLR -/- submetidas a diferentes dietas.** 2022. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/360460704_Variacoes_oxidativas_e_histologicas_dos_ovarios_de_camundongas_LDLR_-_submetidas_a_diferentes_dietas. Acesso em: 17 out. 2024.
- ADONA, Paulo Roberto; MONZANI, Paulo Sérgio; GUEMRA, Samuel; MIRANDA, Moysés dos Santos; OHASHI, Otavio Mitio. **Ovogênese e Foliculogênese em Mamíferos.** 2012. Disponível em: <https://journalhealthscience.pgsskroton.com.br/article/view/691>. Acesso em: 09 out. 2024.
- AMAESTRA, Sebastiano; FLORA, Silvio de; MICALE, Rosanna T.. **Effect of cigarette smoke on DNA damage, oxidative stress, and morphological alterations in mouse testis and spermatozoa.** 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1438463914000819>. Acesso em: 10 out. 2024.
- ANDRADE JÚNIOR, Dahir Ramos de; SOUZA, Rodrigo Becco de; SANTOS, Sânia Alves dos; ANDRADE, Dahir Ramos de. **Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares.** 2005. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbpneu/a/4XxwFHWKq75QXk8K7nv948z/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 29 set. 2024.
- ANTUNES NETO, Joaquim Maria Ferreira. **Formação de espécies reativas de oxigênio e exercício físico.** 2012. Disponível em: <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwjT2bW1m5aJAxUWQ7gEHQE4NMAQFnoECB4QAQ&url=https%3A%2F%2Fportalnet.unirioja.es%2Fdescarga%2Farticulo%2F4730354.pdf&usg=AOvVaw3mWqb318tjowhGyn2tS1qU&opi=89978449>. Acesso em: 10 out. 2024.
- ANTUNES NETO, Joaquim Maria Ferreira; RIVERA, Rodrigo José Battibugli; CALVI, Régis Georgis; RAFFA, Maryellen Fernandes; DONADON, Caio César; PEREIRA, Angélica Gomes; MELO, Patrícia da Silva. **Níveis Comparativos de Estresse Oxidativo em**

Camundongos em Duas Situações do Limite Orgânico: Overreaching Induzido por Treinamento de Natação e Câncer. 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbme/a/TRHQFqvkb7C9nRbRqtQzpGt/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 06 out. 2024.

ARAÚJO, Évelyn de Sousa; GARCIA, Rosane Scussel; DAMBRÓS, Betina; PIENIZ, Simone; SCHNEIDER, Augusto; ABIB, Renata Torres. **Impacto da suplementação de vitamina C sobre níveis de peroxidação lipídica e glutathione reduzida em tecido hepático de camundongos com imunossupressão induzida por ciclofosfamida.** 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rn/a/LV9y8K3Hm97CHRqwYJw9BMC/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 17 out. 2024.

ASAMI, S; MANABE, H; MIYAKE, J; TSURUDOME, Y; HIRANO, T; YAMAGUCHI, R; ITOH, H; KASAI, H. **Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in a central site of the human lung.** 1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9328173/>. Acesso em: 09 out. 2024.

ATTLAS, The Tobacco. **Health Effects.** Disponível em: <https://tobaccoatlas.org/challenges/health-effects/>. Acesso em: 24 jul. 2024.

BARBOSA, Brenna de Sousa; SANTOS, Fernanda Araujo dos; PIMENTEL, Muriel Magda Lustosa; FERNANDES, Denilsa Pires; PREXEDES, Érika Almeida; BEZERRA, Marcelo Barbosa. **Histórico do desenvolvimento do cultivo de células animais. Uma Revisão.** 2015. Disponível em: <http://www.higieneanimal.ufc.br/seer/index.php/higieneanimal/article/view/245>. Acesso em: 10 out. 2024.

BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira; COSTA, Neuza Maria Brunoro; ALFENAS, Rita de Cássia Gonçalves; PAULA, Sérgio Oliveira de; MINIM, Valéria Paula Rodrigues; BRESSAN, Josefina. **Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios.** 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rn/a/Fvg4wkYjZPgFs95f4chVjx/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 17 out. 2024.

BARREIROS, André L. B. S.; DAVID, Jorge M.; DAVID, Juceni P. **ESTRESSE OXIDATIVO: RELAÇÃO ENTRE GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS E DEFESA DO ORGANISMO.** 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/K9hDbHkb3D3KPkgpLz7fg7k/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 17 set. 2024.

BATTISTON, Francielle Garghetti. **Homeostase glicêmica em ratas com perda de função ovariana e tratadas com glicocorticoide.** Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/136502>. Acesso em: 24 jul. 2024.

BAVARESCO, Ana Cristina Mercio. **O PAPEL DA CATALASE NA PROTEÇÃO CONTRA O ENVELHECIMENTO DA PELE: UMA ANÁLISE INTEGRATIVA.** 2023. Disponível em: <https://repositorio-api.animaeducacao.com.br/server/api/core/bitstreams/512759b2-9adb-4859-a9a5-d57a4218830f/content>. Acesso em: 20 nov. 2024.

BERGENDI, L; BENES, L; DURACKOVÁ, Z; FERENCIK, M. **Chemistry, physiology and pathology of free radicals.** 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10576429/>. Acesso em: 05 out. 2024.

BETTERIDGE, Keith J; WAELEHLI, Rudolf O; CHRISTIE, Heather L; RAESIDE, James I; A QUINN, Bette; HAYES, M Anthony. **Relationship between the timing of prostaglandin-induced luteolysis and effects on the conceptus during early pregnancy in mares.** 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22401273/>. Acesso em: 24 jul. 2024.

BIRBEN, Esra; SAHINER, Umit Murat; SACKESEN, Cansin; ERZURUM, Serpil; KALAYCI, Omer. **Oxidative stress and antioxidant defense.** 2012. Disponível em: pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23268465/. Acesso em: 09 out. 2024.

BIRBEN, Esra; SAHINER, Umit Murat; SACKESEN, Cansin; ERZURUM, Serpil; KALAYCI, Omer. **Oxidative stress and antioxidant defense.** 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23268465/>. Acesso em: 05 out. 2024.

BIZARRO-SILVA, Camila; SENEDA, Marcelo Marcondes. **Cultivo in vitro de folículos pré-antrais bovinos: revisão, desafios, conquistas e perspectivas futuras**. 2021. Disponível em:

<http://www.cbpa.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v45/n3/RB897%20Bizarro%20Silva%20p.131-147.pdf>. Acesso em: 17 out. 2024.

BOLZÁN, A D; BIANCHI, M s; BIANCHI, N O. **Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in human blood: influence of sex, age and cigarette smoking**. 1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9316738/>. Acesso em: 29 set. 2024.

BONFIM, Monalisa Medrado. **Efeitos do estresse oxidativo durante a produção in vitro de embriões bovinos sobre o miR-199a e genes alvo ERBB2 e ERBB3**. 2017. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/74/74135/tde-14062017-111158/publico/ME7145575COR.pdf>. Acesso em: 29 set. 2024.

CAMPOS, Marco Túlio Gomes; LEME, Fabiola de Oliveira Paes. **Estresse oxidativo: fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial**. 2018. Disponível em: <https://www.pubvet.com.br/uploads/b6549d41cf307ea6ef99fec75354f20f.pdf>. Acesso em: 16 out. 2024.

CASTRO, Danielle Barbara Pereira de; AMARAL, Hallya Beatriz Sousa. **EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DA INSULINA TRANSFERRINA SELÊNIO (ITS) NA PRODUÇÃO E QUALIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS**. 2022. Disponível em: <https://www.publicacoes.uniceub.br/pic/article/view/8945>. Acesso em: 15 set. 2024.

COMHAIR, Suzy A. A.; ERZURUM, Serpil C. **Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases**. 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12114185/>. Acesso em: 08 out. 2024.

COMINETTI, Cristiane; BORTOLI, Maritsa Carla de; ABDALLA, Dulcinéia Saes Parra; COZZOLINO, Silvia Maria Franciscato. **Considerations about oxidative stress, selenium and nutrigenetics**. 2011. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-614408>. Acesso em: 07 set. 2024.

COSTA, Francisco das Chagas; VASCONCELOS, Erlândia Márcia; SILVA, José Roberto Viana; BATISTA, Ana Liza Paz Souza. **Influência das espécies reativas de oxigênio durante o cultivo in vitro de oócitos e folículos ovarianos de mamíferos domésticos**. 2022.

Disponível em: <http://www.cbma.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v46/n1/RB901%20Costa%20p.28-42.pdf>. Acesso em: 28 set. 2024.

CRUZAT, Vinicius Fernandes; PETRY, Éder Ricardo; TIRAPEGUI, Julio. **Glutamina: Aspectos Bioquímicos, Metabólicos, Moleculares e Suplementação**. 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbme/a/BSkcq7h33h7KZny4jnmY5vb/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 03 out. 2024.

DOS SANTOS, Vanessa Sardinha. **Gametogênese: onde ocorre, tipos e mapa mental**. 2008. Disponível em: <https://brasilescola.uol.com.br/biologia/gametogenese.htm>. Acesso em: 17 out. 2024.

DRAPER, H H; HADLEY, M. **Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation**. 1990. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2233309/>. Acesso em: 11 out. 2024.

FENTON, H. J. H.. **Oxidation of tartaric acid in presence of iron**. 1894. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/1894/ct/ct8946500899>. Acesso em: 09 set. 2024.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.s.. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo**. 1997. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ramb/a/FBtqwzvhJhcCgRbYZtp4yTQ/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 09 out. 2024.

FERRO, Camila de Oliveira; CHAGAS, Vera Lucia Antunes; OLIVEIRA, Marcus Fernandes de; OLIVEIRA, Pedro Lagerblad de; SCHANAIDER, Alberto. **Atividade da catalase no pulmão, rim e intestino delgado não isquemiado de ratos após reperfusão intestinal**. 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rcbc/a/YwLXZk4z7d9wm35pgTCwdFw/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 08 out. 2024.

FRANSOLET, Maïté; LABIED, Soraya; HENRY, Laurie; MASEREEL, Marie-Caroline; ROZET, Eric; KIRSCHVINK, Nathalie; NISOLLE, Michelle; MUNAUT, Carine. **Strategies for Using the Sheep Ovarian Cortex as a Model in Reproductive Medicine**. 2014. Disponível em: Strategies for Using the Sheep Ovarian Cortex as a Model in Reproductive Medicine. Acesso em: 24 jul. 2024.

GANNON, A.M.; STAMPFLI, M.R.; FOSTER, W.G.. **Dysregulation of mitochondrial dynamics and activation of the autophagy cascade occur in a mouse model of cigarette smoke-induced ovarian follicle loss**. 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028212015397>. Acesso em: 17 out. 2024.

GANNON, Anne Marie; STÄMPFLI, Martin R; FOSTER, Warren G. **Cigarette smoke exposure leads to follicle loss via an alternative ovarian cell death pathway in a mouse model**. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22003194/>. Acesso em: 17 out. 2024.

GHAFFARI, Mohammad Ali; ROSTAMI, Morad. **Lipid Peroxidation and Nitric Oxide Levels in Male Smokers' Spermatozoa and their Relation with Sperm Motility**. 2011. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3719338/pdf/JRI-13-81.pdf>. Acesso em: 16 out. 2024.

GOMES, R.G.; LISBOA, L.A.; SILVA, C.B.; MAX, M.C.; MARINO, P.C.; OLIVEIRA, R.L.; GONZÁLEZ, S.M.; BARREIROS, T.R.R.; MARINHO, L.s.R.; SENEDA, M.M.. **Improvement of development of equine preantral follicles after 6 days of in vitro culture with ascorbic acid supplementation**. 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X1500240X>. Acesso em: 01 out. 2024.

GONÇALVES, Juan Carlos Ramos; SOBRAL, Marianna Vieira. **Cultivo de células da teoria à bancada**. João Pessoa: Editora Ufpb, 2020. 169 p. Disponível em: <https://www.editora.ufpb.br/sistema/press5/index.php/UFPB/catalog/view/669/839/7054>. Acesso em: 07 out. 2024.

GOUGEON, A.; BUSSO, D. **Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary.** 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10963871/>. Acesso em: 25 set. 2024.

GOUVEIA, Silas da Silva; LIMA, Adeânio Almeida. **RELAÇÃO ENTRE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E A PROMOÇÃO CARCINOGENÉTICA.** 2017. Disponível em: https://www.mastereditora.com.br/periodico/20171001_161829.pdf. Acesso em: 09 out. 2024.

GUTIERREZ, Lucila Ludmila Paula. **AValiação do estresse oxidativo sistêmico e órgão-específico na intoxicação crônica por cloreto de mercúrio.** 2002. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/3606/000340711.pdf?sequence=1#:~:text=os%20grupos%20experimentais%2C%20observou-se%2C%20em%20relação%20ao,e%202%20e%20aumentou%20na%204%20semana%2C>. Acesso em: 20 nov. 2024.

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John M. C.. **Free Radicals in Biology and Medicine.** 2015. Disponível em: <https://academic.oup.com/book/40045>. Acesso em: 05 out. 2024.

HIRSHFIELD, A N. **Development of follicles in the mammalian ovary.** 1991. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2001918/>. Acesso em: 01 out. 2024.

HU, Yufei; ZHANG, Zhujun; YANG, Chunyan. **The determination of hydrogen peroxide generated from cigarette smoke with an ultrasensitive and highly selective chemiluminescence method.** 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003267007013839>. Acesso em: 24 jul. 2024.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, José. **Histologia Básica Texto & Atlas.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 558 p.

KASPER, Cornelia; EGGER, Dominik; LAVRENTIEVA, Antonina. **Basic Concepts on 3D Cell Culture.** 2021. Disponível em: <https://boku.ac.at/en/dbt/ictct/mission-statement-core-topics/3d-cell-cultivation>. Acesso em: 10 out. 2024.

KOCYIGIT, A.; EREL, O.; GUR, S.. **Effects of tobacco smoking on plasma selenium, zinc, copper and iron concentrations and related antioxidative enzyme activities**. 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11849622/>. Acesso em: 05 out. 2024.

LEAC. **TBARS/MDA Universal Colorimetric Detection Kit - K077-H1**. Disponível em: <https://www.leaclab.com.br/kits-elisa-e-colorimetricos/stress-oxidativo-colorimetrico/tbars-mda-universal-colorimetric-detection-kit-k077-h1>. Acesso em: 02 out. 2024.

LEE, Hae-Miru; KIM, Cho-Won; HWANG, Kyung-A.; SUNG, Jae-Hyuck; LEE, Jin-Kyu; CHOI, Kyung-Chul. **Cigarette smoke impaired maturation of ovarian follicles and normal growth of uterus inner wall of female wild-type and hypertensive rats**. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S089062381630418X>. Acesso em: 16 out. 2024.

LIMA, Dayanne Sarah; VOLTARELLI, Fabrício Azevedo; KIETZER, Kátia Simone. **Verificação de um biomarcador de estresse oxidativo em atletas de natação em período específico de treinamento físico**. 2015. Disponível em: <https://www.rbpfex.com.br/index.php/rbpfex/article/view/746>. Acesso em: 08 out. 2024.

LIMA,  mersom Silva; ABDALLA, Dulcineia Saes Parra. **Peroxida o lipídica: mecanismos e avalia o em amostras biológicas**. 2001. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/255635936_Peroxidacao_lipidica_mecanismos_e_a_valiacao_em_amostras_biologicas. Acesso em: 26 jul. 2024.

LIMA-VERDE, Ib; BRUNO, Jb; MATOS, Mht; RODRIGUES, Apr; FIGUEIREDO, Jr; OLIVEIRA, Mal; LIMA, Pf. **Medicina Veterinária, Recife, v.1, n.1, p.81-88, jan-jun, 2007 ISSN 1809-4678 Implica es do estresse oxidativo no ovário e no embrião mamífero**. 2007. Disponível em: <https://www.journals.ufrpe.br/index.php/medicinaveterinaria/article/view/740/619>. Acesso em: 17 out. 2024.

LUCCI, Carolina M; SILVA, R.V; CARVALHO, C.A; FIGUEIREDO, R; B O, N. **Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles**. 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0921-4488\(01\)00196-1](https://doi.org/10.1016/s0921-4488(01)00196-1). Acesso em: 24 jul. 2024.

MARTINI, Denise Zanatta; MACK, Josiel; LINARES, Carlos Eduardo Blanco; BOLZAN, Rodrigo. **Efeito da exposição à fumaça do cigarro sobre parâmetros comportamentais e peroxidação lipídica em camundongos.** 2010. Disponível em: [325277943_Efeito_da_exposicao_a_fumaca_do_cigarro_sobre_parametros_comportamentais_e_peroxidacao_lipidica_em_camundongos](#). Acesso em: 16 out. 2024.

MARTINS, Fabricio Sousa; SILVA, José Roberto Viana; RODRIGUES, Ana Paula Ribeiro; FIGUEIREDO, José Ricardo de. **Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos.** 2008. Disponível em: <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RB135%20pag36.pdf>. Acesso em: 28 set. 2024.

MENDES, Ana Paula Alves; PEREIRA, Rafaela Corrêa; ANGELIS-PEREIRA, Michel Cardoso de. **ESTRESSE OXIDATIVO E SISTEMAS ANTIOXIDANTES: CONCEITOS FUNDAMENTAIS SOB OS ASPECTOS DA NUTRIÇÃO E DA CIÊNCIA DOS ALIMENTOS.** 2020. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/345183828_ESTRESSE_OXIDATIVO_E_SISTEMAS_ANTIOXIDANTES_CONCEITOS_FUNDAMENTAIS_SOB_OS_ASPECTOS_DA_NUTRICAO_E_DA_Ciencia_DOS_ALIMENTOS. Acesso em: 10 out. 2024.

MOKASHI, Rajashri; DASGUPTA. **Assessment of impact of varied preconditioning factors, used in isolation and combination, for enhancement of cytokine secretions in stem cell conditioned medium.** 2020. Disponível em: <https://www.bibliomed.org/mnsfulltext/125/125-1563623868.pdf?1727205712>. Acesso em: 04 out. 2024.

MOLINARO, Etelcia; CAPUTO, Luzia; AMENDOEIRA, Regina. **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde.** Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 2010. 254 p. Disponível em: <file:///C:/Users/Vitoria/Downloads/Livro%20EPSJV%20010023.pdf>. Acesso em: 07 out. 2024.

MONTENEGRO, Luís; MAGALHÃES, Paulo; GUERREIRO, Adriana Costa; BRANDÃO, Catarina; PINTO, Anabela; ALMEIDA, Henrique; MARTINS-BESSA, Ana; SILVA, Elisabete. **The Contribution of the Sheep and the Goat Model to the Study of Ovarian**

Ageing. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36829547/>. Acesso em: 24 jul. 2024.

NASCIMENTO-JÚNIOR, Braz José do. **Anatomia humana sistemática básica.** 2020. Disponível em: <https://biblioteca.uniscied.edu.mz/handle/123456789/1218>. Acesso em: 24 jul. 2024.

O'BRIEN, Marilyn J.; PENDOLA, Janice K.; EPPIG, John J.. **A Revised Protocol for In Vitro Development of Mouse Oocytes from Primordial Follicles Dramatically Improves Their Developmental Competence.** 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12606400/>. Acesso em: 17 out. 2024.

OLIVEIRA, Eliane Gouvêa de; POLISSENI, Juliana; GUERRA, Martha Oliveira; PETERS, Vera Maria. **MECANISMOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS ENVOLVIDOS NA OVOGÊNESE.** 2009. Disponível em: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/11/964312/546-1681-1-pb.pdf>. Acesso em: 13 out. 2024.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Who.int.** Disponível em: <https://www.who.int>. Acesso em: 23 jul. 2024.

PERES, Carmem Maldonado; CURI, Rui. **Como cultivar células.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 283 p.

PERSAUD, T.V.N.; MOORE, Keith L. **Embriologia Clínica.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. Disponível em: <https://redlara.com/images/arq/Embriologia-Clinica-Moore-Persaud-8-Ed-2008-Pt-Br.pdf>. Acesso em: 09 out. 2024.

RIBEIRO, Sonia Machado Rocha; QUEIROZ, Jose Humberto de; PELUZIO, Maria do Carmo Gouveia; COSTA, Neuza Maria Brunoro; MATTA, Sergio Luiz Pinto da. **A FORMAÇÃO E OS EFEITOS DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NO MEIO BIOLÓGICO.** Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. 2005. Disponível em: <https://seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/6617>. Acesso em: 15 out. 2024.

RODRIGO, Ramón; GUICHARD, Cristián; CHARLES, Roberto. **Clinical pharmacology and therapeutic use of antioxidant vitamins**. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17391284/>. Acesso em: 10 out. 2024.

RÜSSE, I. **Oogenesis in cattle and sheep**. 1983. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6847603/>. Acesso em: 08 out. 24.

SADEU, J C; FOSTER, W G. **Effect of in vitro exposure to benzo[a]pyrene, a component of cigarette smoke, on folliculogenesis, steroidogenesis and oocyte nuclear maturation**. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21172420/>. Acesso em: 10 out. 2024.

SAEED-ZIDANE, Mohammed; LINDEN, Lea; SALILEW-WONDIM, Dessie; HELD, Eva; NEUHOFF, Christiane; THOLEN, Ernst; HOELKER, Michael; SCHELLANDER, Karl; TESFAYE, Dawit. **Cellular and Cellular and exosome mediated molecular defense mechanism in bovine granulosa cells exposed to oxidative stressexosome mediated molecular defense mechanism in bovine granulosa cells exposed to oxidative stress**. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29117219/>. Acesso em: 15 set. 2024.

SANTOS, William Alves; VASCONCELOS, Darizy Flavia Silva Amorim de; CAIRES, Diogo Ramon Santos; VALENÇA, Samuel dos Santos; SILVA, Fabiano Leichsenring. **Resposta ao exercício físico aeróbico tipo natação sobre o estado oxidativo cardíaco induzido por inalação de fumaça de cigarro em ratos Wistar**. 2014. Disponível em: <https://periodicos.ufba.br/index.php/cmbio/article/view/12943>. Acesso em: 05 out. 2024.

SCAINI, Giselli; REZIN, Gislaine T.; CARVALHO, Andre F.; STRECK, Emilio L.; BERK, Michael; QUEVEDO, João. **Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder: Evidence, pathophysiology and translational implications**. 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0149763415301263>. Acesso em: 20 set. 2024.

SIDDIQUE, Shabana; SADEU, Jean C; FOSTER, Warren G; FENG, Yong-Lai; ZHU, Jiping. **In vitro exposure to cigarette smoke induces oxidative stress in follicular cells of F₁ hybrid mice**. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23720242/>. Acesso em: 16 out. 2024.

SIES, H. **Oxidative stress: from basic research to clinical application**. 1991. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1928209/>. Acesso em: 24 jul. 2024.

SIES, Helmut; BERNDT, Carsten; JONES, Dean P. **Oxidative Stress**. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28441057/>. Acesso em: 10 out. 2024.

SILVA, Andreza Amaral da; GONÇALVES, Roberto Calderon. **Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais**. 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/Gw3txS7SVpcCCdLjf7BVPpG/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 16 out. 2024.

SMITH, Stuart J.; WILSON, Martin; WARD, Jennifer H.; RAHMAN, Cheryl V.; PEET, Andrew C.; MACARTHUR, Donald C.; ROSE, Felicity R. A. J.; GRUNDY, Richard G.; RAHMAN, Ruman. **Recapitulation of Tumor Heterogeneity and Molecular Signatures in a 3D Brain Cancer Model with Decreased Sensitivity to Histone Deacetylase Inhibition**. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23272238/>. Acesso em: 15 out. 2024.

SOBINOFF, A.P.; BECKETT, E.L.; JARNICKI, A.G.; SUTHERLAND, J.M.; MCCLUSKEY, A.; HANSBRO, P.M.; MCLAUGHLIN, E.A.. **Scrambled and fried: Cigarette smoke exposure causes antral follicle destruction and oocyte dysfunction through oxidative stress**. 2013. Disponível em: Scrambled and fried: Cigarette smoke exposure causes antral follicle destruction and oocyte dysfunction through oxidative stress. Acesso em: 17 out. 2024.

ST-PIERRE, Julie; A BUCKINGHAM, Julie; ROEBUCK, Stephen J; BRAND, Martin D. **Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain**. 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12237311/>. Acesso em: 08 set. 2024.

THERIAULT, A. ; CHAO, J T; WANG, Q; A GAPOR,; ADELI, K. **Tocotrienol: a review of its therapeutic potential**. 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10480444/>. Acesso em: 24 jul. 2024.

TODOROVIĆ, Nevena; TOMANOVIĆ, Nada; GASS, Peter; FILIPOVIĆ, Dragana. **Olanzapine modulation of hepatic oxidative stress and inflammation in socially isolated**

rats. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26474692/>. Acesso em: 08 out. 2024.

TOKUHIRO, Keizo; DEAN, Jurrien. **The Zona Pellucida Facilitates Fertilization, Blocks Polyspermy and Protects Pre-Implantation Embryos.** 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/322847858_The_Zona_Pellucida_Facilitates_Fertilization_Blocks_Polyspermy_and_Protects_Pre-Implantation_Embryos. Acesso em: 07 out. 2024.

TORRES, Larissa Helena Lobo. **Efeitos da inalação da fumaça de cigarro no estresse oxidativo do sistema nervoso central de camundongos jovens.** 2009. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9141/tde-16092009-150022/publico/MestradoLarissaTorres.pdf>. Acesso em: 05 out. 2024.

VINCENT, Heather K; INNES, Kim e; VINCENT, Kevin R. **Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity.** 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17924865/>. Acesso em: 09 set. 2024.

WANG, Xia; FALCONE, Tommaso; ATTARAN, Marjan; GOLDBERG, Jeffrey M; AGARWAL, Ashok; SHARMA, Rakesh K. **Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate.** 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12477524/>. Acesso em: 01 out. 2024.

WIEACKER, P; MUELLER, C R; A MAYEROVA,; GRZESCHIK, K H; ROPERS, H H. **Assignment of the gene coding for human catalase to the short arm of chromosome 11.** 1980. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6967289/>. Acesso em: 01 out. 2024.

YAGI, K. **Lipid peroxides and human diseases.** 1987. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3319232/>. Acesso em: 11 out. 2024.

