

EFEITO DA *ALOE VERA* NO CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS INCLUSOS NO TECIDO OVARIANO DE BOVINOS

Mônica Dias Soares ¹
Francisco das Chagas Costa ²
Venância Antônia Nunes Azevedo ³
Ana Liza Paz Souza Batista ⁴

INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores exportadores de carne bovina do mundo e esta produção é umas das principais atividades da economia brasileira (IBGE, 2017). O desenvolvimento de rebanhos observado possui impacto significativo no cenário socioeconômico mundial, atuando como fonte de renda para criadores, além de produzir alimento de alto valor nutricional e contribuir com valioso material genético voltado às pesquisas para reprodução animal (EMBRAPA, 2008). Nesse sentido, as biotecnologias reprodutivas têm mostrado grande relevância no que se refere ao aumento da eficiência reprodutiva desses rebanhos de elevado potencial econômico.

Dentre as biotécnicas capazes de maximizar o potencial reprodutivo das fêmeas domésticas, a Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais (MOIFOPA), objetiva recuperar a população de folículos pré-antrais do ambiente ovariano para posterior cultivo *in vitro* até o estado de maturação, tal técnica surge como uma alternativa viável a fim de promover a alta produção de embriões. Além disso, existe a possibilidade de poder ser utilizada na reprodução humana já que muitas estratégias têm sido desenvolvidas para prevenir a infertilidade em mulheres jovens e meninas submetidas a tratamentos oncológicos, o que pode aumentar significativamente as possibilidades de retomada da função reprodutiva após procedimentos de radio ou quimioterapias. Para isso, a MOIFOPA pode ser aliada a diversas outras biotécnicas como a criopreservação de embriões, oócitos e tecido ovariano, e o autotransplante do tecido ovariano, por exemplo (SILVA, et al., 2017).

No entanto, o sucesso do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais depende da otimização dos sistemas de cultivo que sejam capazes de manter a sobrevivência e suportar o crescimento de oócitos inclusos nos folículos pré-antrais até atingirem sua completa maturação. Além disso, a realização eficaz das etapas de cultivo como a fragmentação e isolamento pode evitar danos estruturais e garantir a sobrevivência folicular. Contudo, o cultivo de folículos ovarianos representa um desafio, uma vez que a maioria destes tornam-se gradualmente atresícos durante a fase de cultivo *in vitro*, necessitando portanto, de sistemas eficientes de cultivo que promovam o crescimento e minimizem a perda folicular (ARAÚJO, 2014; BECK *et al.*, 2018), bem como a identificação de novas substâncias que não sejam

¹Graduando do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual Vale do Acaraú –UVA, msoaresdias219@gmail.com;

² Mestrando do Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará - UFC, biofrankcosta@hotmail.com;

³ Mestranda do Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará – UFC, venancianunes@gmail.com

⁴ Professora Orientadora do Programa de pós graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, campus Sobral – UFC, analiza@sobral.ufc.br

tóxicas à célula e que sejam capazes de sustentar de maneira eficaz o desenvolvimento folicular *in vitro*.

Nesse contexto, a utilização de produtos naturais principalmente os extratos de plantas ao meio de cultivo tem se mostrado uma estratégia cada vez mais promissora, uma vez que estes compostos alternativos se tornam mais viáveis pela praticidade e valor comercial. Dentre estes, a *Aloe vera* (AV) tem se mostrado promissora por suas características citoprotetoras (MORAIS et al., 2012). A *Aloe Vera* pertencente à família *Asphodelaceae*, subfamília *Asphodeloideae* apresentando os nomes populares de babosa-verdadeira, Aloe-debarbados e Aloe-de-curaçau (CASTRO e RAMOS, 2002). Investigações já foram realizadas com o extrato de AV, a exemplo de Souza et al. (2016) que realizaram estudos substituindo o crioprotetor gema de ovo pelo extrato de AV, com objetivo de proteger as células espermática contra o choque térmico e alterações estruturais da membrana plasmática durante o armazenamento a baixas temperaturas, obtendo satisfatórios na conservação de espermatozoides. No entanto, a aplicabilidade da AV no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos ainda não foi observada. Dessa forma, estudos *in vitro* podem avaliar a toxicidade e influência da AV na integridade e no desenvolvimento de folículos pré-antrais ovarianos bovino.

Diante disso, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da adição da *Aloe vera* como antioxidante em protocolos de cultivo de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano bovino, em diferentes concentrações de *Aloe vera* (1%, 5%, 10% e 50%).

METODOLOGIA

A pesquisa envolveu o efeito da AV sobre o tecido ovariano bovino cultivado por 6 dias e caracteriza-se como experimental apresentando uma abordagem quantitativa. (NEDEL e SILVEIRA, 2016). O experimento foi realizado no laboratório de Biotecnologias Reprodutivas da Universidade Federal do Ceará, *Campus Sobral* sob aprovação de comitê de ética. Os ovários utilizados foram provenientes de animais selecionados para abate, na cidade de Sobral - CE. A coleta de dados foi realizada nos meses de outubro e novembro de 2018. Foram utilizados obtidos ovários bovinos (n=10) em abatedouro local provenientes de cinco vacas adultas. Após a coleta os mesmos passaram por lavagem asséptica e foram, então, transportados ao laboratório em até 1h acondicionados em NaCl a 0,9% suplementado com penicilina (100 mg/mL) e estreptomicina (100 mg/mL) a 4°C. No laboratório, foram selecionados ovários que apresentassem morfologia normal. Após isso, foram submetidos a fragmentação do córtex em fragmentos de 3x3x1mm em Meio Essencial Mínimo (MEM) suplementado com HEPES e antibiótico.

Uma representação de fragmentos ovarianos de cada animal foi fixados em Carnoy por 12 h (controle *in vivo*) e submetido a análise histológica, na qual foi observada a morfologia e crescimento folicular. Os demais fragmentos ovarianos foram cultivados *in vitro* individualmente durante seis dias em placas de 24 poços, contendo 1 mL de meio de cultivo (MEM) suplementado com 0,05 IU/mL de FSH, 5 ng/mL de selênio, 110 µg/mL de piruvato, 10 µg/mL de insulina, 50 µg/mL de ácido ascórbico, 5,5 µg/mL transferrina, 1,25 mg/mL de BSA, 100 µg/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina, 2 mM de glutamina e 2 mM de hipoxantina. Foram testadas 4 concentrações de AV (1%, 5%, 10% e 50%), desta forma foram definidos 5 tratamentos: MEM⁺, MEM⁺ + 1% AV, MEM⁺ + 5% AV, MEM⁺ + 10% AV e MEM⁺ + 50% AV.

As condições de cultivo foram a 39 °C em uma atmosfera de 5% CO₂. A cada dois dias foi realizada a troca do meio de cultivo sendo 60% substituído por meio fresco. Após o período de cultivo foi realizada histologia clássica, em cada tratamento. Para isso, os

fragmentos foram inicialmente fixados em Carnoy por 12 h e destinados ao processamento histológico. De acordo com o aspecto qualitativo, os folículos pré-antrais foram classificados como morfológicamente normais e degenerados, considerando as seguintes características para normais: ausência de corpos picnóticos, organização das células da granulosa e para degenerados: presença de corpos picnóticos, retração citoplasmática e desorganização das células da granulosa.

DESENVOLVIMENTO

O ovário mamífero contém milhares de oócitos, inclusos em sua maioria (cerca de 90%) nos folículos pré-antrais. Apesar deste enorme capital oocitário, uma ínfima proporção desses oócitos (cerca de 0,1%) será ovulado e, conseqüentemente, poderão ter alguma possibilidade de serem fecundados. Considerando-se que a quase totalidade dos oócitos será eliminada pelo processo de atresia, caso permaneça no interior dos ovários, a utilização da biotécnica de Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Pré-antrais (MOIFOPA) permite “resgatar ou isolar os FOPA a partir dos ovários antes que eles se tornem atrésicos e cultivá-lo em vitro, juntamente com os oócitos imaturos neles inclusos, até o estágio de maturação, prevenindo-os, dessa forma, da atresia” (LIMA e SANTOS, 2010). “Com isso, torna-se possível potencializar a reprodução assistida de animais geneticamente superiores através do fornecimento de milhares de oócitos para a produção *in vitro* de embriões, bem como subsidiar as demais biotécnicas reprodutivas” (ROSSETTO et al, 2011).

Nesse contexto, sistemas de cultivo vêm sendo estudadas com o intuito de promover adequado desenvolvimento folicular *in vitro*. No entanto, além do método de recuperação, o cultivo *in vitro* e a manutenção da viabilidade dessas estruturas continuam sendo um grande desafio, motivando a realização de pesquisas que sejam capazes de proporcionar o adequado desenvolvimento folicular e a manutenção de sua ultraestrutura e, portanto, o desenvolvimento oocitário. Nesse sentido, a utilização de extratos vegetais tem ganhado bastante espaço. (SAADIA et al, 2015).

Com esse objetivo, tem sido estudada a adição de várias substâncias naturais ao meio de cultivo *in vitro*. Em estudos com a espécie suína, por exemplo, a utilização de dois extratos vegetais (*Kefir* e *Spirulina maxima*) foi capaz de manter o desenvolvimento de folículos pré-antrais sem apresentar citotoxicidade (PLAZAS, 2015; SOUZA, et al., 2016) e o extrato de *Amburana cearenses* utilizado em estudos com folículos ovarianos de cabras e ovelhas, mostrou resultados satisfatórios (BARBERINO et al., 2016; GOUVEIA et al., 2016). No mesmo sentido a frutalina, uma substância de origem vegetal com potencial anticancerígeno, foi investigada quanto a sua toxicidade e, efeitos na maturação e fertilização *in vitro* de oócitos de suínos (SILVA et al., 2018) apresentando efeito positivo na eficiência da fertilização *in vitro* dependendo da concentração de frutalina que será utilizada no procedimento.

Dentre os vegetais cujos extratos são potencialmente utilizáveis no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos, a *Aloe vera* (*Aloe Barbardensis Miller*) é uma planta que apresenta ação antisséptica, anti-inflamatória, antitumoral, antiviral, hidratante e antienvhecimento, laxativa e propriedades cicatrizantes, proteção solar e ativação do sistema imune (NUNES, 2017). Cresce naturalmente em climas secos e quentes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este é o primeiro trabalho que avalia o extrato de AV como componente citoprotetor para cultivo *in situ* do tecido ovariano da espécie bovina. A análise histológica dos folículos ao final do período de cultivo demonstrou diferença estatística significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$). Já em relação a folículos degenerados verificou-se que os grupos MEM, AV1% e AV5% apresentaram maiores taxas de degeneração na comparação com o controle não cultivado. No entanto, no grupo AV10% foram observadas menores taxas de folículos degenerado na comparação com o grupo MEM ($p < 0.05$).

Quando se comparou as diferentes categorias foliculares (primordiais, primários e secundários) observou-se que entre os folículos primordiais o grupo MEM apresentou melhores taxas de folículos morfológicamente normais na comparação com os grupos AV1%, AV5% e AV10%, apresentando, no entanto, resultados similares ao grupo AV50%. Dessa forma as concentrações AV10% e AV50% são melhores em relação as outras. Observou-se na verificação dos folículos primários, que o grupo AV5% apresentou melhores taxa de folículos normais do que o controle não cultivado. Em relação aos demais tratamentos não foram observadas diferenças significativas. Já na categoria de folículos secundários foi possível verificar que o grupo AV1% foi melhor que o controle não cultivado, não se observando, porém, diferença em relação aos demais tratamentos. Quando a análise foi centrada nos folículos em desenvolvimento (primários e secundários) não se observou diferença em nenhum dos grupos ($p < 0.05$).

A normalidade dos folículos foi verificada pela manutenção de parâmetros morfológicos satisfatórios de oócitos e células da granulosa (CG), importantes indicadores da saúde dos folículos. Essas células têm como função a proteção e o suporte do gameta feminino e são necessárias ao seu adequado desenvolvimentos. Além disso, CG têm papel predominante na regulação hormonal da gônada feminina (SILVA, 2016).

Esses efeitos positivos da AV sobre parâmetros morfológicos podem estar associados à atividade antioxidante do extrato da planta, tendo em vista que já é conhecida a importância da adição de antioxidantes em meios de cultivo de células e tecidos a exemplo de selênio, ácido ascórbico e transferrina (LINS et al., 2017). No entanto, a necessidade dessa adição constante de suplementos com propriedade antioxidante pode onerar e tornar menos acessível o cultivo de células foliculares. Dessa forma, o uso do extrato de AV é uma estratégia promissora e de baixo custo como fonte alternativa de suplemento com atividade citoprotetora contra o estresse oxidativo (BARBERINO et al., 2016).

Tendo em vista a propriedade da AV de ativar e manter a morfologia normal dessa categoria folicular, fica evidente a importância da utilização desse extrato como aliado no desenvolvimento de sistemas de cultivo eficientes capazes de manter controlada a produção de espécies reativas de oxigênio. Essa observação é corroborada por estudos que já identificaram importantes componentes antioxidantes presentes no extrato de AV, como fenóis totais, flavonoides, ácido ascórbico, β -caroteno e α -tocoferol (SOUZA et al., 2016). Além desses compostos, outros podem ainda colaborar com os efeitos positivos da AV a exemplo de polissacarídeos (glicose, galactose e xilose), tanino, esteroides, ácidos orgânicos, substâncias antibióticas, enzimas de vários tipos, resíduos de açúcar, uma proteína com 18 aminoácidos, vitaminas, minerais (sulfato, ferro, cálcio, cobre, sódio, potássio, manganês), dentre outros (MACIEL et al., 2015).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos dados observados concluiu-se que a adição do extrato de AV foi capaz de manter a morfologia e promover o desenvolvimento dos folículos em todos os grupos testados mantendo a integridade do tecido ovariano de bovino cultivado *in vitro* por 6 dias. Além disso, não se observou efeito tóxico do extrato em nenhuma das concentrações utilizadas. Esses achados adicionam importante contribuição para o aprimoramento da biotécnica de MOIFOPA. No entanto, mais estudos se fazem necessários para elucidar os mecanismos através dos quais o extrato de AV atua na atenuação do estresse oxidativo, bem como testar outras concentrações com vistas a avaliar melhor possíveis efeitos tóxicos sobre gametas de fêmeas mamíferas.

Palavras-chave: Antioxidante; *Aloe vera*; Cultivo; Ovários; Bovino.

REFERÊNCIAS

ALVES, A. F et al. **Substituição de farelo de soja por farelo de algodão de alta energia em dietas para vacas leiteiras:** consumo, digestibilidade de nutrientes, eficiência de nitrogênio e produção de leite. *Rev. Bras. Zootec.*, 39 (3): 532-540, 2010

ARAÚJO, V. R et al. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. **Reproductive biology and endocrinology**, v. 12, n. 1, p.78-92, 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1186/1477-7827-12-78>.

BECK, K. et al. Short-term culture of adult bovine ovarian tissues: chorioallantoic membrane (CAM) vs. traditional in vitro culture systems. **Reproductive Biology And Endocrinology.**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.2-10, 9 mar. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12958-018-0337-y>.

BARBERINO R.S. et al. Amburanacearensis leaf extract maintains survival and promotes in vitro development of ovine secondary follicles. **Zygote**, v. 24 (2), p. 277–285, abr. 2016.

CASTRO, L. O.; RAMOS, R. L. D. Cultivo de três espécies de babosa: descrição botânica e cultivo de *Aloe arborescens* Mill. babosa-verde, *Aloe saponaria* (Aiton) Haw. babosa-listrada e *Aloe vera* L. Burm. f., babosa-verdadeira ou aloe-de-curaçau (ALOEACEAE). **FEPAGRO**, Porto Alegre, v. 10 (20), p.1-12, 2002.

EMBRAPA INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA. **Produção e produtividade agrícola.** Editores técnicos: Ana Christina Sagebin Albuquerque, Aliomar Gabriel da Silva. - Brasília, DF, v.1, 2008.

GOUVEIA B. B. et al. Supplemented base medium containing *Amburana cearensis* associated with FSH improves in vitro development of isolated goat pré-antral follicles. **Theriogenology**. v. 86(5), p. 1275-1284, 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **IBGE.** Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias>. Acesso em: 14 de maio de 2018.

LIMA, G.L.; SANTOS, E.A.A. Aplicação das biotécnicas de moifopa, transgênese e clonagem na reprodução de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.4, p.536-542, 2010.

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

MACIEL, M. A. P. Cinética espermática, criopreservação do sêmen e composição bioquímica do plasma seminal de diferentes espécies de peixes characiformes. Fortaleza, 2015. **Tese de doutorado**, Universidade Estadual do Ceará, 2015.

MORAIS, T.P. et al. Applications of tissue culture in medicinal plants. **Rev. bras. Plantas med.** vol.14(1), 2012.

NEDEL, W. L.; FERNANDO DA SILVEIRA, F. Os diferentes delineamentos de pesquisa e suas particularidades na terapia intensiva. **Rev. Bras Ter. Intensiva**, v. 28, n. 3, p.256-260, 2016.

NUNES, T.G. P. Uso do gel de *Aloe vera* na congelação do sêmen suíno, como crioprotetor alternativo. Fortaleza, 2017. **Dissertação de mestrado**, Universidade Estadual do Ceará, 2017.

PLAZAS, D.C.S. Efeito dos extratos de *SpirulinaMaxima* e *Kefir* no cultivo de folículos pré-antrais de suíno. Curitiba, 2015. **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal do Paraná, 2015.

ROSSETTO, R. et al. Avanços no isolamento e sistemas de cultivo de folículos préantrais. **Rev. Acta Veterinaria Brasilica**. v.5, n.1, p.15-23, 2011.

SAADIA, et al. Recent advances in food biopeptides: production, biological functionalities and therapeutic applications. **Biotechnonology Advances**, V.33(1), p. 80-116, 2015.

SILVA, A.W.B. Localização de proteínas, quantificação de RNAm e papel das citocinas TNF- α e IL-1 β no desenvolvimento folicular in vivo e in vitro em bovinos. **Tese de doutorado**. Universidade Federal do Ceará, 2016.

SILVA, J. R. L., et al. Propriedades terapêuticas da aloe vera (babosa). In II **CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Campina Grande-PB, Ed. Realize, 2017.

SILVA, B. R. **Efeitos da frutalina (lectina da fruta pão - Artocarpus incisa) durante a maturação e fertilização in vitro de oócitos suínos**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Ceará, 2018.

SOUZA, A.L.P et al. Use of *Aloe vera*-based extender for chilling and freezing collared peccary (Pecari tajacu) semen. **Theriogenology**, v.85, n.8, p.1-7, 2016.