



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**ESTUDO DA ATIVIDADE DO EXTRATO ETANÓLICO DE  
*SELAGINELLA CONVOLUTA* SOBRE O CRESCIMENTO *IN VITRO* DE  
FOLÍCULOS OVINOS.**

**Renata Gomes Revorêdo**

Recife – PE

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**ESTUDO DA ATIVIDADE DO EXTRATO ETANÓLICO DE  
*SELAGINELLA CONVOLUTA* SOBRE O CRESCIMENTO *IN VITRO* DE  
FOLÍCULOS OVINOS.**

**Renata Gomes Revorêdo**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da RENORBIO (PPGB-RENORBIO), como requisito para obtenção do título de doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia em Agropecuária

Linha de pesquisa: Conservação e multiplicação de germoplasma

Orientadora: Profa. Dr. Aurea Wischral.

Co-orientador: Prof. Dr. André Mariano.

Recife – PE

2020

R454e Revorêdo, Renata Gomes  
ESTUDO DA ATIVIDADE DO EXTRATO ETANÓLICO DE SELAGINELLA CONVOLUTA SOBRE O  
CRESCIMENTO IN VITRO DE FOLÍCULOS OVINOS. / Renata Gomes Revorêdo. - 2020.  
76 f. : il.

Orientadora: Aurea Wischral.  
Coorientadora: Andre Mariano Batista.  
Inclui referências, apêndice(s) e anexo(s).

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Doutorado em Biotecnologia – Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Recife, 2020.

1. Caatinga. 2. Citoproteção. 3. Ovelhas. 4. Ovários. 5. S. convoluta. I. Wischral, Aurea, orient. II. Batista, Andre Mariano, coorient. III. Título

CDD 620.8

---

**Renata Gomes Revorêdo**

**ESTUDO DA ATIVIDADE DO EXTRATO ETANÓLICO DE  
*SELAGINELLA CONVOLUTA* SOBRE O CRESCIMENTO *IN VITRO* DE  
FOLÍCULOS OVINOS.**

Tese apresentada à Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia em Agropecuária

**Aprovada em 17 de fevereiro de 2020 por:**

---

Presidente: Profa. Dra. Áurea Wischral (RENORBIO/UFRPE)

---

1º Examinador: Prof Dr. Lúcio Esmeraldo Honório de Melo (UFRPE)

---

2º Examinador: Prof. Dr. Diogo Manoel Farias da Silva (UNINASSAU)

---

3º Examinador: Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida  
(UNIVASF/RENORBIO)

---

4º Examinador: Profa. Dra. Eulina Tereza Nery Farias (UNIFACOL)

## AGRADECIMENTOS

É de praxe agradecer primeiramente a Deus. Mas, não é porque todos fazem que eu esteja fazendo. E sim, pelo simples fato de que esta força maior me mostrou o caminho da tranquilidade e da determinação durante toda esta jornada. Sem a crença que isto seria possível, nada teria acontecido. Por isto, primeiramente agradeço a Deus;

Aos meus grandes e melhores amigos, meus Pais. Toda esta vitória é uma forma de recompensar o apoio, a dedicação e todo o amor que recebi. Vocês são minha luz, minha inspiração, minha vida...

A Michael Ricardo, meu noivo lindo e daqui uns dias esposo, que, com toda paciência e carinho do mundo aguentou um período de estresse, ausência, loucuras e que ainda ajudou-me nas coletas, 05h00min em Gravatá!!! É por você e com você que busco cada dia melhorar, crescer e batalhar; Eu te amo muito, meu príncipe;

A Rafael, meu irmão abusado e amado, a Francielle, minha cunhada maravilhosa, e a Dudinha, minha sobrinha linda, que com a leveza e descontração da sua presença tanto me ajuda a relaxar. Amo vocês;

A Lulu, minha cadela-amiga-filha, minha fonte de inspiração, minha fortaleza, meu amor! Tanto você me ensinou e ensina nesses mais de 15 anos, do acadêmico ao sentimental, minha maior professora. Você foi meu atlas, por algumas vezes modelo experimental e ainda me ensinou a ser sociável, a amar, e principalmente, ensinou o que realmente devo cuidar e amar. A York de mamãe formou grande parte da veterinária e humana que aqui escreve;

A todos da minha família, que de alguma forma ajudaram a me acalmar e me apoiaram com seus conselhos, mas principalmente a minha tia Edinha, minha querida tia, que, mesmo sendo louca (kkkk...), cuida de mim e do meu currículo (kkkk...) com muita paciência e carinho. Amo todos;

Aos Professores André Mariano e Áurea Wischral, por terem me aceitado como orientada. Obrigada pelas inspirações, pelos puxões de orelha, pelos ensinamentos compartilhados e principalmente pela paciência e carinho de sempre;

Aos Professores Jackson Almeida e Eulina Farias, pelo imensurável auxílio durante todo o projeto;

Ao professor, Lucio Esmeraldo Honório de Melo, que tanto contribuiu para meu crescimento profissional e pessoal, agradeço ainda pela amizade, pelo apoio, pelo carinho e por nunca ter largado minha mão desde o segundo período da graduação;

A todos os Professores da minha graduação e pós-graduação, sem vocês eu certamente não estaria aqui. A todos os colaboradores indiretos, em especial a Alcir, que me ajudou muito durante estes quatro anos do Curso de Doutorado;

A Secretaria de Saúde do Recife, por colaborar com meu crescimento pessoal e profissional, todas as minhas solicitações para estudo foram atendidas. Como funcionária só há motivos para agradecer, consegui dedicar-me ao meu sonho com ajuda da instituição. Em especial, gostaria de agradecer a algumas chefias que passaram em minha vida e me marcaram profundamente: Zelia Brilhante, Layane Alves, e Agnes Freitas, vocês com maestria e acima de tudo humanidade foram ferramentas essenciais para minha formação. E, tão importante quanto, gostaria de deixar registrado o meu eterno muito obrigado ao Dr Vicente André Gomes, que tanto lutou pelo meu sonho;

Aos meus amigos (Daniel, Tamys, Bel, Diogo, Paulinho, Lucas, Vitor, Ceci, Aninha, Avani, Raquel, Jania, Paula, Ylka, Lucia, Paty, Janete... ), presentes que a Universidade e trabalho me deram, obrigada por todas as gargalhadas, perrengues, experimentos, viagens, passeios, confraternizações, plantões e acima de tudo, pela amizade compartilhada, muito obrigada. Vocês marcaram minha vida;

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela concessão da Bolsa de Doutorado; à Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) por toda minha formação; e à Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) pela oportunidade do curso de Doutorado. Meus sinceros agradecimentos;

Por fim, agradeço aqueles que me encantam, minha paixão! Os animais. Em especial, agradeço às ovelhas, animais sensíveis e inteligentes, fáceis de trabalhar, que me fascinam desde o início da graduação. De todo meu coração, muito obrigada, sem vocês com toda certeza, eu não teria chegado aqui.

*À Secretaria de Saúde do Recife, por colaborar de  
forma ímpar com meu crescimento pessoal e  
profissional.*

**Dedico**



“As nossas crenças se transformam em pensamentos.  
Nossos pensamentos se transformam em palavras.  
Nossas palavras se tornam ações.  
Nossas ações se tornam hábitos.  
Nossos hábitos se tornam valores.  
E nossos valores revelam o nosso destino.”

**- Gandhi**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

**BMP-15:** Proteína morfogenética óssea 15

**CC:** Controle cultivado

**CNC:** Controle não cultivado

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**DHT:** Dihidrotestosterona

**E<sub>2</sub>:** Estradiol

**EGF:** Fator de crescimento epidermal

**ER:** Receptores estrogênicos

**FGF:** Fator de crescimento fibroblástico

**FSH:** Hormônio folículo estimulante

**GDF-9:** Fator de crescimento e diferenciação-9

**IGF-1:** Fator de crescimento semelhante à insulina

**KGK:** Fator de crescimento de queratinócitos

**KL:** Kit ligand

**OMS:** Organização Mundial da Saúde

**P<sub>4</sub>:** Progesterona

**RENORBIO:** Rede Nordeste de Biotecnologia

**RL:** Radical livre

**ROS:** Espécies reativas ao oxigênio

***S. convoluta* :** *Selaginella convoluta*

**SC1:** Extrato de *Selaginella convoluta* concentração 0,1 mg/mL

**SC2:** Extrato de *Selaginella convoluta* concentração 0,2 mg/mL

**SC4:** Extrato de *Selaginella convoluta* concentração 0,4 mg/mL

**SC8:** Extrato de *Selaginella convoluta* concentração 0,8 mg/mL

**StAR:** Proteína aguda reguladora da esteroidogênese

**VEGF:** Fator de crescimento do endotélio vascular

**VIP:** Peptídeo intestinal vasoativo

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Revisão de Literatura</b>	
<b>Figura 1:</b> Esquema categorias foliculares	22
<b>Figura 2:</b> Esquema esteroidogênese	25
<b>Artigo 1</b>	
<b>Figura 1:</b> Rendimento médio de folículos de acordo com a categoria de escore corporal.	52
<b>Figura 2:</b> Total de folículos de acordo com a categoria de classificação.	52
<b>Figura 3:</b> Total de folículos normais de acordo com a categoria de classificação.	53
<b>Figura 4:</b> Porcentagem de folículos de acordo com a ativação.	53
<b>Figura 5:</b> Imagem representativa de cortes histológicos de fragmentos ovarianos ovinos corados com hematoxilina e eosina. Folículos normais (N) e folículos degenerados (D).	53
<b>Artigo 2</b>	
<b>Figura 1:</b> Porcentagem (%) de folículos ativados e não ativados de acordo com as diferentes concentrações de EEB de <i>S. convoluta</i> .	68
<b>Figura 2:</b> Percentuais (%) de folículos normais e degenerados após cultivo em diferentes concentrações de EEB de <i>S. convoluta</i> .	68
<b>Figura 3:</b> Análise histológica de fragmentos ovarianos ovinos corados com hematoxilina e eosina,	68

após 8 dias de cultivo.

**Figura 4:** Diâmetro de folículos de acordo com a categoria e ativação após cultivo com diferentes concentrações de EEB de *S. convoluta*. 69

**Figura 5:** Diâmetro de oócito de acordo com a categoria e ativação após cultivo com diferentes concentrações de EEB de *S. convoluta*. 69

**Figura 6 A:** Percentual (%) de área marcadas para espécies reativas ao oxigênio (ROS) após cultivo *in vitro* com diferentes concentrações de EEB de *S. convoluta*. 69

**Figura 6 B:** Níveis de espécies de oxigênio (ROS) no tecido ovariano de ovelhas por diacetato de 20,70-diclorofluoresceína (CM-H2DCFDA; Molecular Probes, Life Technologies, Eugene, EUA). 69

## LISTA DE TABELAS

**Página**

### **Artigo 1**

<b>Tabela 1.</b>	Determinação dos parâmetros físico, laboratorial e reserva ovariana.	52
------------------	--	----

**Página**

### **Artigo 2**

<b>Tabela 1.</b>	Determinação de Fenóis totais (FT), flavonoides totais (FVT) e atividade antioxidante em extrato etanólico bruta de <i>S. convoluta</i> (EEBSC).	67
------------------	--	----

## RESUMO

Baseado no tema plantas medicinais e das funções etnomedicinais atribuídas a *Selaginella convoluta* (jericó, mão-fechada ou mão-de-papagaio) objetivou-se avaliar *in vitro* a influência da suplementação de extrato de *Selaginella convoluta* em meio de cultura de folículos ovarianos ovinos e com isto criar evidências científicas sobre as reais propriedades da espécie vegetal sobre o sistema reprodutor feminino. O primeiro experimento baseou-se na investigação de possíveis relações entre grau de hígidez, condição nutricional e reserva ovariana em fêmeas ovinas. Selecionou-se em um abatedouro local, 10 fêmeas ovinas mestiças, adultas em idade reprodutiva. Durante a sangria foram colhidas amostras de sangue, para realização de hemograma, e perante a abertura das carcaças os ovários das fêmeas selecionadas foram adquiridos e processados sob técnica histológica para avaliação da qualidade celular dos mesmos, posteriormente agrupados por categoria de parâmetros clínicos e por escore corporal. Após análise conclui-se que animais com escore corporal acima de 3 apresentam maior reserva ovariana e de melhor qualidade celular. Com base nos resultados do experimento descrito acima definiu-se as características dos animais participantes do segundo experimento: fêmeas ovinas mestiças, adultas em idade reprodutiva, hígdas e com escore corporal 3. A metodologia baseou-se na fragmentação dos ovários e cultivo por 8 dias em  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> suplementado ou não com diferentes concentrações de *S. convoluta* (0,0; 0,1; 0,2; 0,4 ou 0,8 mg/mL). Depois da cultura, o tecido ovariano foi destinado à análise morfológica e pesquisa de espécies reativas ao oxigênio (ROS). Com o objetivo de investigar os efeitos da adição do extrato etanólico bruto (EEB) de *Selaginella convoluta* no cultivo *in vitro* de folículos inclusos em tecido ovariano ovino, observou-se que todos os grupos testados permitiram a ativação folicular, porém os cultivados com EEB de *Selaginella convoluta* permitiram maior ativação e menor degeneração, sendo os melhores resultados expressos na concentração de 0,8 mg/mL. Quanto à pesquisa de ROS, a suplementação do meio revelou uma redução nos níveis de ROS. Com base nos achados do Experimento 2, pode-se concluir que neste estudo a suplementação de meio de cultivo celular com EEB de *S. convoluta* revelou marcante atividade citoprotetora, pois conservou a morfologia celular, estimulou o desenvolvimento e diminuiu a formação de ROS no cultivo *in situ*.

**Palavras-chave:** Caatinga, citoproteção, ovelhas, ovários, *S. convoluta*.

## ABSTRACT

Based on the theme of medicinal plants and the ethnomedicinal functions attributed to *Selaginella convoluta* (jericho, closed-hand or parrot-hand), the objective was to evaluate *in vitro* the influence of supplementation with extract of *Selaginella convoluta* in the culture medium of ovarian follicles and sheep thereby creating scientific evidence about the real properties of the plant species on the female reproductive system. The first experiment was based on the investigation of possible relationships between degree of hygiene, nutritional condition and ovarian reserve in ovine females. In a local slaughterhouse, 10 crossbred female sheep, adults of reproductive age, were selected. During the bleeding, blood samples were collected to perform a complete blood count, and when the carcasses were opened, the ovaries of the selected females were acquired and processed using histological technique to assess their cell quality, subsequently grouped by body drainage category. After analysis, it is concluded that animals with a body score above 3 have greater ovarian reserve and better cell quality. Based on the results of the experiment described above, the characteristics of the animals participating in the second experiment were defined: crossbred female sheep, adults of reproductive age, healthy and with body runoff 3. The methodology was based on the fragmentation of the ovaries and cultivation for 8 days in  $\alpha$ -MEM + supplemented or not with different concentrations of *S. convoluta* (0.0; 0.1; 0.2; 0.4 or 0.8 mg / mL). After culture, the ovarian tissue was used for morphological analysis and research of reactive oxygen species (ROS). In order to investigate the effects of adding *Selaginella convoluta* crude ethanolic extract (EEB) to the *in vitro* culture of follicles included in ovarian ovine tissue, it was observed that all tested groups allowed follicular activation, however those cultivated with EEB from *Selaginella convoluta* allowed greater activation and less degeneration, with the best results expressed in the concentration of 0.8 mg / mL. As for ROS research, supplementation of the medium revealed a reduction in ROS levels. Based on the findings of Experiment 2, it can be concluded that in this study the supplementation of cell culture medium with EEB of *S. convoluta* revealed marked cytoprotective activity, as it conserved cell morphology, stimulated development and decreased the formation of ROS in culture *in situ*.

**Keywords:** Caatinga, cytoprotection, sheep, ovaries, *S. convoluta*.



## SUMÁRIO

### Página

	<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b>	
	<b>LISTA DE FIGURAS</b>	
	<b>LISTA DE TABELAS</b>	
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>20</b>
<b>2.1</b>	<b>Ovinocultura no Nordeste Brasileiro</b>	<b>20</b>
<b>2.2</b>	<b>Fisiologia reprodutiva da fêmea</b>	<b>21</b>
<b>2.3</b>	<b>Biotecnias aplicadas à reprodução animal</b>	<b>30</b>
<b>2.4</b>	<b>Antioxidantes usados no cultivo celular</b>	<b>31</b>
<b>2.5</b>	<b>Plantas medicinais e fitoterápicos</b>	<b>32</b>
<b>2.6</b>	<i>Selaginella convoluta</i>	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>36</b>
<b>4</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>37</b>
<b>5</b>	<b><u>Capítulo 1</u></b> - Inter-relação entre escore de condição corporal e reserva ovariana em fêmeas ovinas.	<b>47</b>
<b>6</b>	<b><u>Capítulo 2</u></b> - Extrato de <i>Selaginella convoluta</i> permite o crescimento e a sobrevivência de folículos pré-antrais ovinos por inibir o estresse oxidativo durante o cultivo <i>in situ</i> .	<b>60</b>
<b>7.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>75</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>76</b>

## INTRODUÇÃO

Apesar do mercado de ovinos apresentar forte tendência de crescimento, o setor demonstra um desequilíbrio na produção, tornando-se necessário o trabalho conjunto, incluindo boas práticas de manejo sanitário e reprodutivo no rebanho, qualidade do abate (90% dos abates no Nordeste são clandestinos), e ainda, padronização da comercialização (COUTO & MEDEIROS, 2000).

Os problemas enfrentados pelos produtores no Nordeste brasileiro são inúmeros, porém visivelmente perceptíveis, principalmente decorrentes de práticas de manejo inadequadas, ocasionadas por negligência pessoal e governamental. Isto leva à insuficiência de produtividade ao mercado, resultando em dificuldades na sustentabilidade, competitividade e renda dos produtores (ROSA NOVA, 2004; CORDÃO, 2011). Assim, é essencial qualificar os produtores e oferecer assistência técnica, por meio de Instituições de Ensino, Pesquisa e Extensão, para que se consiga, desta forma, elevar as taxas de produtividade do rebanho (COELHO et al, 2011).

Com este intuito, alguns trabalhos especificamente envolvendo a área de reprodução animal, usando como base ferramentas biotecnológicas, vêm tentando desenvolver um sistema capaz de aumentar a taxa de fertilidade dos rebanhos, aumentando desta forma o rendimento da produção.

Ultimamente tem sido observado um expressivo aumento no número de estudos científicos envolvendo, de alguma forma, plantas medicinais, estudos estes que são de grande interesse para o Ministério da Saúde, que conta com o Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. Acredita-se que na flora brasileira aproximadamente duas mil espécies sejam usadas como remédios naturais pela população (BRASIL, 2009).

Neste estudo propõe-se como objeto a *Selaginella convoluta*, espécie pertencente à família Sellaginellaceae, conhecida popularmente como “jericó”, “mão-fechada” ou “mão-de-papagaio” (AGRA et al, 2007; AGRA et al, 2008). A planta apresenta, entre seus constituintes químicos, compostos classificados como flavonoides, biflavonoides, esteroides, antioxidantes e fenóis (LEE et al, 2009; SÁ et al, 2012) e, na

medicina popular, atribui-se a ela inúmeras funções, entre elas aumentar da fertilidade feminina (ALMEIDA et al, 2005; AGRA et al, 2007; AGRA et al, 2008).

Apesar de o ovário mamífero ser um órgão que fornece um ambiente adequado para a produção de várias substâncias, com hormônios e fatores de crescimento, além de liberar os gametas femininos para o processo de reprodução dos animais (JOHNSON, 2003), a maioria dos folículos, presentes no ovário, não chega a ovulação (cerca de 99,9%) sofrendo um processo fisiológico de atresia durante seu crescimento e maturação (MARKSTROM et al, 2002).

Sendo assim, pesquisas vêm tentando desenvolver um sistema de cultivo *in vitro* capaz de manter a viabilidade bem como promover o crescimento de folículo pré-antral (FOPA) e antral, uma vez que o cultivo dessa classe folicular resultaria no fornecimento de milhares de ovócitos viáveis, aumentando o rendimento da produção *in vitro* (PIV) (RODRIGUES, 2010).

Considerando os constituintes da planta e sua relação com a fertilidade, a suplementação de extrato de *Selaginella convoluta* em meio de cultura de folículos, poderá influenciar positivamente as células que compõem a unidade folicular, células do cumulus e oócito, promovendo o crescimento e maturação *in vitro* como também melhorando a viabilidade celular. Assim, a partir deste estudo *in vitro*, poderemos avaliar o seu uso como princípio ativo direcionado para o sistema reprodutora feminino.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 OVINOCULTURA NO NORDESTE BRASILEIRO**

No contexto do agronegócio, a ovinocaprinocultura é uma atividade econômica explorada mundialmente e, especificamente no Brasil, desenvolve relevante papel, pois gera oportunidade de emprego, renda e conseqüentemente fixação no campo (FILHO, 2002). A ovinocultura tornou-se uma atividade econômica de relevante importância para a região Nordeste, pois agrega um grande valor social por adaptar-se às variações de clima (CORDÃO, 2011).

A origem da ovinocultura no Nordeste deu-se quando animais de raças europeias foram introduzidas por jesuítas e colonizadores. Estes animais eram criados de forma extensiva e sofreram mecanismos de seleção natural para adaptarem-se as novas condições de clima, solo e alimentação impostas, originando as raças nativas (COUTO & MEDEIROOS, 2000).

O Nordeste conta hoje com um plantel de mais de 50% do rebanho nacional de ovinos, constituído basicamente por animais na sua maioria deslanados, sem raça definida (SRD) ou mestiços. As principais raças envolvidas são Santa Inês, Morada Nova, Somalis Brasileira, Cariri e seus mestiços, Dorper e seus cruzamentos. Os animais possuem material genético de boa qualidade, porém há necessidade do emprego de técnicas para manter a regularidade da produção e aumentar a oferta, pois como consequência da seleção natural e adaptação, ocorreu redução na capacidade produtiva dos rebanhos nas raças nativas (COUTO & MEDEIROS, 2000; FERREIRA, 2006).

A região Nordeste brasileira possui área em torno de 166 milhões de hectares, onde aproximadamente 65% pertencem ao semiárido (LIRA et al, 1990). A maior parte dos rebanhos do semiárido brasileiro concentra-se na caatinga, e tem criação de forma extensiva (MARQUES et al, 2007) e, apesar de grande, o rebanho possui índices de produtividade, produção e rentabilidade baixos (SILVA SOBRINHO & MORENO, 2009).

A produção ovina nordestina ainda está basicamente direcionada para a subsistência, porém se a tradição nordestina nesta cultura for associada a ações públicas

e privadas, pode surgir uma excelente região produtora de ovinos e caprinos, atendendo assim à constante e crescente demanda do mercado (FERREIRA, 2006).

## 2.2 FISILOGIA REPRODUTIVA DA FÊMEA

Ao nascimento, o tecido ovariano já apresenta definida a quantidade total de oócitos (ou óvulos) que uma fêmea será capaz desenvolver durante a sua vida reprodutiva, comportando fisiologicamente poucos folículos antrais e milhares de pré-antrais, os quais podem ser recuperados e criopreservados ou cultivados, tornando-se grandes aliados dos programas de reprodução (CUSHMAN et al, 2002; TELFER, 1996). Com isto, é necessário compreender a fisiologia do sistema reprodutor feminino e os mecanismos envolvidos *in vivo*, que possam ser empregados *in vitro*.

### 2.2.1 Embriologia das células germinativas

No período gestacional, quando o ovário do feto encontra-se em desenvolvimento, suas células germinativas primordiais (ovogônias) migram do saco vitelino do embrião para a crista genital, multiplica-se por mitoses sucessivas, atingindo milhões de células. Posteriormente algumas ovogônias iniciam a primeira divisão da meiose, chegando até a profase I, convertendo-se em ovócitos primários. A primeira divisão da meiose apenas se completa na ovulação, portanto os ovócitos primários vivem até à menopausa (VEJLSTED, 2012).

Simultaneamente a ovogênese ocorre degeneração/atresia de muitos ovócitos, reduzindo drasticamente o número destes, do nascimento ao início da puberdade. Este processo é causado por apoptose, caracterizado pelo aumento da produção de radicais livres e pela degradação do DNA por endonucleases. O ovócito torna-se necrótico, a cromatina sofre picnose e as células da granulosa também degeneram. Em contraste com o sexo masculino, no sexo feminino o número de células reprodutoras diminui continuamente até que, na menopausa, poucos ovócitos restarão e a capacidade reprodutora terminará (ANTONIOLLI, 2002).

A formação de folículos ovarianos inicia no ovário fetal, quando o ovócito entra na meiose e é rodeado por uma camada de células fusiformes provenientes do estroma ovariano, constituindo-se no folículo primordial. Posteriormente estas

células fusiformes transformam-se em células cubóides (células da granulosa) e o folículo passa a designar-se por folículo primário. As células da granulosa dividem-se e constituem diversas camadas, criando o folículo secundário, e segregam mucopolissacarídeos que constituem um halo protector do ovócito - a zona pelúcida. O folículo secundário continua a crescer, enquanto o ovócito atinge o seu diâmetro máximo, nesta altura, ocorrem dois outros fenômenos: o primeiro é caracterizado pelo formação de mais uma camada de células do interstício, que se diferenciam e constituem a teca interna (células epitelióides semelhantes às da granulosa, segregam hormonas esteróides) e a teca externa (cápsula de tecido conjuntivo altamente vascularizado). Já o segundo fenómeno é marcado pela atividade das células da granulosa, que secretam líquido folicular composto por mucopolissacarídeos, electrólitos, glicosaminoglicanos, hormônios esteróides, oxitocina, activina, inibina, vasopressina e proteínas do plasma (CUNNINGHAM, 2008/ Figura 1).

Um destes folículos vai prosseguir no seu desenvolvimento e o líquido das vesículas coalesce acumula-se numa única área central, o antro - folículo maduro, folículo antral ou folículo de Graaf. À medida que o folículo se desenvolve, o ovócito primário completa a primeira divisão da meiose, transformando-se em ovócito secundário e liberando o primeiro corpo polar, que se fragmenta e acaba por desaparecer. Posteriormente, o ovócito secundário inicia a segunda divisão meiótica, que é interrompida em metafase II, por ação de um fator inibidor da meiose (provavelmente a inibina), completando a meiose apenas se ocorrer fertilização. As células da granulosa deste folículo formam um anel à volta do ovócito e um pedículo que o suporta. O anel designa-se por corona radiata e o pedículo é o cumulus oophorus. Entre o ovócito e a corona radiata mantém-se a zona pelúcida que vai funcionar como barreira à penetração dos espermatozóides (CUNNINGHAM, 2008).

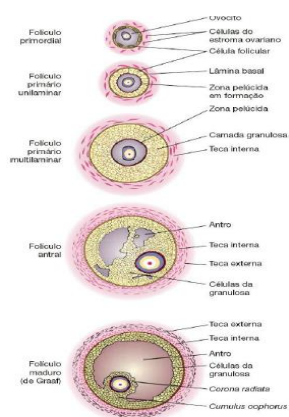


Figura 1 - Esquema categorias foliculares  
 Fonte: Histologia Básica, 2013.

### 2.2.2 Foliculogênese

A foliculogênese trata do crescimento e maturação folicular, partindo do folículo primordial e culminando com o estágio de folículo pré-ovulatório, envolvendo mudanças que ocorrem na parede folicular (SAUMANDE, 1981).

Como comentado anteriormente, a função ovariana tem início no período fetal e, sob influência dos hormônios maternos, os folículos ovarianos do feto apresentam crescimento e atresia, do nascimento à puberdade as gônadas femininas ficam sem atividade, pois neste momento a função hipolâmica e hipofisária ainda está ausente, posteriormente segue-se a puberdade, marcada pela atividade funcional do hipotálamo e hipófise, fazendo os ovários começarem seu funcionamento (ANTONIOLLI, 2002).

O início da atividade ovariana é marcado pela ativação dos folículos primordiais e, conseqüentemente, pela saída do estado de quiescência para iniciarem seu crescimento. Os mecanismos que controlam o processo e sua continuidade são controlados por hormônios gonadotróficos e somatotróficos, além de fatores extraovarianos e intrafoliculares (MARTINS et al, 2008).

O processo de ativação e crescimento de folículos pré-antrais depende de inúmeros fatores agindo sobre as células da granulosa, da teca e sobre o ovócito (SILVA, 2011). A função destes fatores pode ocorrer de forma isolada ou conjunta, e ainda moldar o efeito de hormônios, sinalizando deste modo uma interação entre substâncias intra e extraovarianas regulando o crescimento folicular (SILVA, 2011).

Contudo, naturalmente neste processo de desenvolvimento, a grande maioria dos folículos morre, estando este fenômeno ligado a duas diferentes vias: uma ocasionada por falha na oferta de nutrientes e oxigênio, denominada atresia por degeneração e a outra por fragmentação nuclear, denominada atresia por apoptose (RACHID et al, 2000).

### 2.2.3 Esteroidogênese na fêmea

Esteroidogênese, por definição é o processo de formação de estrógenos, caracterizado pela síntese de andrógenos (androstenediona e testosterona), que serão convertidos em estrógenos (estrone e estradiol) (MURAYAMA et al, 2012).

A biossíntese dos esteroides é restrita a alguns tecidos, como córtex das adrenais e gônadas (ovários e testículos), tendo o colesterol como principal precursor. A síntese dos esteroides nas adrenais ocorre na zona reticular, e envolve inicialmente a ação do ACTH estimulando o transporte do colesterol citoplasmático para as mitocôndrias, seguido pela atividade da proteína aguda reguladora da esteroidogênese (StAR), responsável pela translocação do colesterol da membrana mitocondrial externa para a interna, posteriormente sofre ação do complexo enzimático citocromo P450, responsável conversão do colesterol em pregnenolona e posteriormente em progesterona que sofrerá hidroxilação, formando a androstenediona. A androstenediona, por sua vez, terá redução do grupamento C-17-ceto, formando a testosterona. Os estrogênios são formados a partir dos androgênios pela perda da metila C-19 e a formação de um anel aromático (CUNNINGHAM, 2008).

A esteroidogênese ovariana pode seguir duas vias. A primeira é caracterizada pela atividade do LH nas células da teca sobre a enzima StAR, que capta o colesterol circulante que, sob ação de uma enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol intramitocondrial, CYP11A1, é convertido em pregnenolona. Esta, por meio da enzima 3 $\beta$ -hidroxidesidrogenase, é convertida em progesterona (SHIH et al, 2011). A progesterona pode exercer suas funções biológicas, ou, sobre atividade da enzima 17,20-liase, servir como substrato para a produção de androstenediona. Assim, como a progesterona, a androstenediona poderá atuar diretamente, ou, sob a ação da 17- $\beta$ -redutase, ser convertida em outro andrógeno, a testosterona que é convertida em dihidrotestosterona e estradiol pela ação das enzimas 5 $\alpha$ -redutase e aromatase, respectivamente (STOCCO, 2008). Na segunda via citada, a androstenediona sofre aromatização nas células da granulosa sendo convertida em estrona e esta, sob ação da enzima 17 $\beta$ -redutase, transforma-se em estradiol (YARAK et al, 2005).



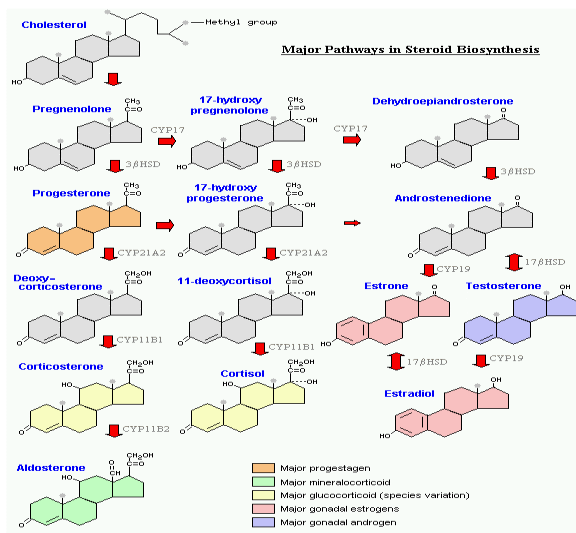


Figura 2 - Biosíntese dos esteróides.  
 Fonte: Silva, 2005.

## 2.2.4 Fatores envolvidos no desenvolvimento folicular

A identificação e a compreensão das diferentes substâncias envolvidas na promoção do crescimento de folículos são aspectos importantes para subsidiar o desenvolvimento de pesquisas envolvendo reprodução animal, vários fatores de crescimento e hormônios estão diretamente relacionados com o processo de foliculogênese.

### Hormônios envolvidos no desenvolvimento folicular

#### Estradiol (E<sub>2</sub>)

Os efeitos biológicos do estradiol estão relacionados à resposta de uma vasta quantidade de órgãos, como o trato reprodutor feminino, glândula mamária, esqueleto, sistema cardiovascular, sistema imune e sistema nervoso central (KORACH et al, 2003; TOMIC et al, 2007).

Particularmente no trato reprodutor feminino, as funções do E<sub>2</sub> estão relacionadas às características sexuais secundárias, secreção de gonadotrofinas, síntese de lipoproteínas, preparação dos tecidos para responder à progesterona e prevenção da atrofia do trato urogenital (NELSON & BULUN, 2001). Basicamente, só os folículos pré-antrais avançados tem a capacidade de produzirem estrógenos, apesar de existirem relatos de produção limitada de E<sub>2</sub> em pequenos folículos pré-

antrais. (DRUMMOND & FINDLAY, 1999) e durante o cultivo folicular *in vitro* (BISHONGA et al, 2001).

As respostas fisiológicas ao E<sub>2</sub> são reguladas por dois fatores: os tecidos envolvidos e o tipo de receptor. Há dois tipos de receptores estrogênicos (ER), ER $\alpha$  e ER $\beta$ ; o ER $\alpha$  é encontrado no trato reprodutor, musculatura esquelética e cardíaca, rins, fígado, hipotálamo e hipófise. Já o ER $\beta$  tem uma menor distribuição, estando presente no trato reprodutor, espermatozóides, pulmões e em algumas áreas do hipotálamo (TOMIC et al, 2007). Receptores do tipo ER $\alpha$  predominam no útero, e encontram-se de forma equilibrada nos ovários (KORACH et al, 2003). Os ER $\alpha$  predominam nas células intersticiais e da teca e o ER $\beta$  nas células da granulosa (COUSE & KORACH, 1999).

Alguns trabalhos concluem que a deficiência de E<sub>2</sub> está ligada ao aumento na atresia folicular e à redução do desenvolvimento de folículos primordiais (THOMPSON et al, 2002) por outro lado, também está envolvido no processo de retomada da meiose (MINGOTI et al, 1995) e de aquisição de competência oocitária para fertilização (PELLICER, 1997). Sugere-se ainda que o efeito do E<sub>2</sub> na maturação pode ser via células do cumulus ou diretamente no oócito. Porém existem particularidades espécie-específicas quando o assunto é o papel do estrógeno sobre a maturação, ovulação e desenvolvimento embrionário (MOUDGAL et al, 1996; DODE & GRAVES, 2003).

#### Progesterona (P<sub>4</sub>)

Hormônio esteroide sintetizado no ovário, secretado pelas células da granulosa, células da teca, células do estroma ovariano e luteais, tendo sua secreção controlada por estímulo das gonadotrofinas e hígidez do ovário (GORE-LANGTON & ARMSTRONG, 1988). A P<sub>4</sub> tem sua ação basicamente no hipotálamo/hipófise, glândula mamária e útero, regulando os níveis de gonadotrofinas e, com isto o crescimento folicular, a ovulação e a luteinização, estimulando também o desenvolvimento da glândula mamária, a diferenciação do endométrio e o desenvolvimento da placenta (KURITA et al, 2001<sup>a</sup>; KURITA et al, 2001<sup>b</sup>)

Existem três tipos de receptores para P<sub>4</sub> (PR): PRA, PRB e PRC, sendo este último relacionado a linhagens de células de câncer de mama (GAVA et al, 2004; WEI E MINER, 1994). Relata-se que a deficiência do receptor PRA gera folículos anovulatórios e conseqüentemente diminuição no número de ovulações (MULAC-

JERICEVIC et al, 2000), já dos PRB não há alteração funcional nos ovários (MULAC-JERICEVIC et al, 2003). Quanto ao PRC, relata-se que sua presença inibe a atividade dos outros receptores citados (WEI & MINER, 1994).

Especificamente em bovinos, há estudos que demonstram que o número de receptores aumenta proporcionalmente ao desenvolvimento do folículo, e que os receptores atuam mediando à atividade protetora da P<sub>4</sub> contra apoptose em células da granulosa de folículos pré-ovulatórios (D'HAESELEER et al, 2007; QUIRK et al, 2004).

### Andrógenos

Os andrógenos são esteroides produzidos durante o desenvolvimento folicular, sintetizados pelas células da teca de folículos em crescimento em resposta ao LH, atuando diretamente ou como substrato da aromatase (precursor de estradiol) (CHENG et al, 2002; TANIGUCHI et al, 2007).

A testosterona e dihidrotestosterona (DHT) são andrógenos que produzem excelente resposta à ação nos ovários, a androstenediona possui baixa afinidade com os receptores, apesar de estar em grande quantidade na circulação (GOYENCHE et al, 2002). Com o desenvolvimento folicular, a dominância do andrógeno é substituída pela dominância do estrógeno (HICKEY et al, 2004), durante a maturação folicular os andrógenos deixam de atuar como hormônio e passam a servir de substrato enzimático (COUSE et al, 2006). Contudo, quando há erros no processo, comprometendo o equilíbrio intrafolicular e os de andrógenos ultrapassam a capacidade esteroidogênica das células da granulosa, ocorre acúmulo dos mesmos, culminado em atresia (GOYENCHE et al, 2002). Os andrógenos estão desta forma envolvidos tanto na morte como na sobrevivência celular.

### Hormônio Folículo Estimulante (FSH)

Gonadotrofina produzida pela hipófise anterior com ação sobre os folículos ovarianos, promovendo crescimento, formação de antro e inibição da apoptose (MATOS et al, 2007).

Foram identificados receptores nas células da granulosa (O'SHAUGHNESSY et al, 1996) e no oócito (MEDURI et al, 2002) a partir de folículos ovarianos primários (OKTAY et al, 1997).

## Ativina

Age em equilíbrio com o FSH na foliculogênese, atuando na estimulação do crescimento folicular e proliferação das células da granulosa (THOMAS et al, 2003). A ativina também promove a manutenção da viabilidade folicular e estimula o crescimento de folículos primários isolados e inclusos (SILVA et al, 2006).

## Fatores envolvidos no desenvolvimento folicular

### Kit ligand (KL)

Estudos demonstram que o KL é um fator derivado das células da granulosa e seu receptor c-kit é expresso pelo ovócito e células da teca (MAYERHOFER et al, 1997), A interação c-kit/KL tem atividade sobre desenvolvimento e sobrevivência folicular (KISSEL et al, 2000), manutenção da competência meiótica (ISMAIL et al, 1997) e regulação da esteroidogênese (HUTT et al, 2006).

### Fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF-9)

Proteína homodimérica, secretada pelo ovócito (BODENSTEINER et al, 1999), pertence à família dos fatores de transformação do crescimento – TGF- $\beta$  (CHANG et al, 2002). Tem função de proliferação de células da teca e granulosa, crescimento (SKINNER, 2002) e sobrevivência dos folículos (HREISSON et al, 2002). Estudos demonstraram que sua deleção leva a infertilidade, por bloqueio da foliculogênese (DONG et al, 1996).

### Proteína morfogenética óssea-15 (BMP-15)

Supõe-se que o início do desenvolvimento folicular pré-antral esteja ligado à interação do KL com a BMP-15 (SHIMASAKI et al, 2003), sabe-se que KL, BMP-15 e GDF-9 se modulam (JOYCE et al, 2000). Estudos já comprovaram que a BMP-15 atua como regulador da mitose das células da granulosa e da foliculogênese inicial (FORTUNE, 2003).

### Fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1)

Segundo Zhou et al. (1996), este fator e seu receptor encontram-se presentes nas células da granulosa, tendo como função estimular a proliferação destas células, o crescimento folicular e manter integridade dos folículos (ZHAO et al, 2001).

#### Fator de crescimento fibroblástico (FGF)

Segundo Van Wezel et al. (1995), este fator encontra-se presente nos ovócitos de folículos, células da granulosa e células da teca, seus receptores encontram-se nas células da granulosa (WANDJI et al, 1992). Entre suas funções pode-se citar: ação sobre o desenvolvimento folicular (ROBERTS & ELLIS, 1999) e diferenciação das células da granulosa (ANDERSON & LEE, 1993).

#### Fator de crescimento de queratinócitos (KGF/ FGF7)

Estudos relatam a produção de KGF por células mesenquimais, (FINCH et al, 1989) e células da teca de folículos antrais, o mesmo exerce influencia sobre crescimento das células da granulosa e estimula o desenvolvimento folicular (SKINNER, 1998).

#### Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF)

O VEGF é um dos responsáveis pela angiogênese folicular, pois atua estimulando a mitose de células endoteliais e aumenta a permeabilidade vascular (REDMER & REYNOLDS, 1996). As gonadotrofinas, em ratas, estimulam a produção de VEGF pelas células da granulosa (KOOS, 1995), enquanto em humanos esse fator é sintetizado pelas células da teca e granulosa (YAMAMOTO et al, 1997), sendo expressos nelas seus receptores Flk-1 e Flk-1/KDR. SO-YOUNG et al. (2006) demonstraram que o cultivo *in vitro* durante 24 horas, em 50 ng/mL de VEGF, antes da criopreservação das células da granulosa de ratas, reduziu os danos pela inibição da apoptose. A administração de 500 ng/mL, diretamente nos ovários de ratas, aumentou significativamente, após 48 horas, a proporção de folículos primários e secundários pequenos (DANFORTH et al, 2001). Já em bovinos, o VEGF (10 ng/mL) estimula a transição de folículos primários para secundários, após 10 dias de cultivo (YANG & FORTUNE, 2007).

#### Fator de crescimento epidermal (EGF)

Proteína encontrada no ovócito e células da granulosa (SILVA et al, 2006), com função de estimular a proliferação das células da granulosa e promove a ativação de folículos primordiais (ANDRADE et al, 2005). Estudos *in vitro* demonstram atividade positiva sobre a formação do antro (MAO et al, 2004), viabilidade e crescimento folicular (ZHOU, 2005).

Peptídeo intestinal vasoativo (VIP)

Neuropeptídeo (HULSHOF et al, 1994), com função sobre a regulação da esteroidogênese (ZHONG & KASSON, 1994) e bloqueio da apoptose (LEE et al, 1999).

### 2.3 BIOTECNIAS APLICADAS À REPRODUÇÃO ANIMAL.

Quando o assunto é produção animal, a biotecnologia torna-se uma ferramenta importante, pois vem desempenhando o importante papel de aumentar a eficiência dos sistemas de produção, gerando produtos em maior qualidade, quantidade e colaborando com a sustentabilidade.

Conceitualmente segundo Wetherington (2010), biotecnologia “é o uso ou manipulação de um organismo ou de seus componentes”. Cronologicamente, segundo a Associação da Carolina do Norte para a Pesquisa Biomédica (2006), pode-se dizer que a biotecnologia tem quatro marcos de ascensão que merecem destaque, o primeiro foi em 1953, quando Watson e Crick apresentaram o modelo de dupla hélice do DNA seguido pela descoberta da enzima restritiva, por Arber, datado de 1960, acompanhado do feito de Cohen e Boyer, em 1973, que conseguiram manipular genes dando início à engenharia genética, e por último, merecendo relevante destaque, em 1977 conseguiu-se realizar transferência de genes de diferentes organismos para bactérias.

As tecnologias e seus avanços na reprodução, seja ela humana ou animal, revelam quatro fases ou gerações, sendo estas classificadas de acordo com as biotécnicas que incluem. A primeira caracteriza-se pelo emprego da inseminação artificial, criopreservação de gametas e embriões; a segunda pela superovulação e transferência de embriões; a terceira pela sexagem, recuperação de oócitos, cultivo celular e fertilização *in vitro*; a quarta caracteriza-se pela clonagem, transgenia e biologia de células-tronco (BERTOLINI & BERTOLINI, 2009).

A Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais (MOIFOPA) já está amplamente difundida, pois busca mimetizar *in vitro* eventos e possíveis efeitos que ocorrem *in vivo*. Contudo, para atingir o objetivo citado, faz-se necessário o desenvolvimento de um sistema de cultivo *in vitro* que forneça o ambiente ideal ao desenvolvimento folicular (SILVA, 2010). Há algum tempo, diversas pesquisas vem abordando o tema, buscando padronizar parâmetros como: tempo de cultivo, utilização de fatores, suplementos e hormônios, pois o “ambiente ideal” ainda não é uma realidade (MATOS et al, 2007).

Para o cultivo de folículos pré-antrais utiliza-se duas técnicas, na primeira os folículos são cultivados, completos, inclusos no tecido ovariano (*in situ*) (BRUNO et al, 2006) e na segunda, os folículos são extraídos de tecido ovariano e cultivados isoladamente (BRITO et al, 2014). O primeiro sistema apresenta como vantagem a manutenção da integridade folicular e com isto garante maior aporte nutricional do meio para o tecido e conseqüentemente para os folículos (TELFER, 1996), permitindo um monitoramento mais preciso e criterioso do crescimento folicular e assim dos efeitos sobre os mesmos (ABIR et al, 2001).

#### 2.4 ANTIOXIDANTES USADOS NO CULTIVO CELULAR

Para o equilíbrio dos processos orgânicos faz-se necessário o uso de energia, e esta, em seres aeróbicos, advém do metabolismo oxidativo. No entanto este metabolismo também resulta em produtos que em excesso tornam-se deletérios aos sistemas, como a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e conseqüentemente a ocorrência do estresse oxidativo (SILVA et al, 2011).

O excesso de radicais livres (RL) pode resultar em infertilidade, pois estruturas como: ovários, espermatozoides e o embrião pré-implantacional, são sensíveis aos agentes oxidantes (ARECHIGA et al. 1998).

Segundo Behrman et al. (2001), essas moléculas interferem na progressão da metáfase II na segunda parada da meiose, levam a uma queda no nível das gonadotrofinas e na produção de ATP, além de promover lesões no DNA. Com base nas pontuações anteriores, sugere-se que as ROS contribuem para uma insuficiência ovariana.

Para a higidez de um organismo faz-se necessário o equilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio e o sistema de defesa antioxidante. Sendo este ultimo classificado

como: enzimático (Superóxido dismutase, Catalase, Peroxirredoxinas e Glutathione) e não enzimático (vitaminas C e E, selênio, ubiquinonas, ácido úrico e ácido lipoico (NORDBERG & ARNÉR, 2001). Porém, em pesquisas *in vitro*, alguns estudos vêm usando como fonte de antioxidantes, além dos fatores citados acima, o extrato vegetal, tomando como base a presença de compostos fenólicos na espécie selecionada (BARBERINO, 2015). Os fenóis de fontes vegetais são definidos como metabólitos secundários presentes em frutas e vegetais e classificados em duas categorias, flavonoides e os não flavonoides. (BURNS et al, 2001; MELO & GUERRA, 2002;). O grupo dos flavonoides ou polifenólicos é formado da combinação de derivados sintetizados da fenilalanina e ácido acético (AHERNE & O'BRIEN, 2002; SELLAPPAN et al., 2002).

Estudos atribuem aos flavonoides funções biológicas como: proteção contra doenças do envelhecimento; atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e vasodilatadora; Além de fornecer um sistema de defesa para as plantas, protegendo contra as agressões do meio ambiente, diferenças genéticas e nutricionais. (SELLAPPAN et al, 2002).

Na atividade bioquímica e farmacológica dos flavonoides podemos ressaltar sua atividade antioxidante, anti-inflamatória, antiplaquetária, antialérgica e antinociceptiva (KOO & SUHAILA, 2001). Os compostos fenólicos não flavonoides ou ácidos fenólicos também são marcados por sua atividade antioxidante e classificam-se em derivados do ácido hidroxicinâmico e derivados do ácido hidroxibenzóico. (BELITZ & GROSCH, 1988; DURÁN & PADILLA, 1993).

## 2.5 PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERAPICOS

Uma das mais antigas práticas da medicina utiliza plantas com objetivo medicinal. Segundo Akerele (1993), em um passado não tão distante assim, início da década de 90, a Organização Mundial da Saúde (OMS) relatou que, em países em desenvolvimento, mais de 2/3 da sua população ainda dependiam de plantas como única forma de cuidados a saúde (BRASIL, 2006).

Especificamente pesquisando os efeitos sobre o sistema reprodutivo, extratos de algumas plantas, como por exemplo, *Sterculia tomentosa* (DALZIEL, 1937), *Justicia insularis* (TELEFO et al, 2012) e *Amburana cearensis* (MATOS et al, 2015a; MATOS



et al, 2015b), foram testados como suplementação na alimentação animal ou como suplementos nos meios de cultivo in vitro de folículos ovarianos. Os resultados apontam para cura nas desordens reprodutivas, fornecimento de folículos ovarianos competentes, e, em adição, as análises bioquímicas do tecido vegetal demonstram compostos cujos efeitos biológicos regulam funções reprodutivas, como exemplo alcaloides, fenóis e flavonoides.

Gradualmente, tem sido observado um expressivo aumento no número de estudos científicos envolvendo, de alguma forma, plantas medicinais e um variado registro de procedimentos utilizando plantas medicinais. Fato de grande interesse para o Ministério da Saúde, que conta com o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2006).

Acredita-se que na flora brasileira aproximadamente duas mil espécies sejam usadas como remédios naturais pela população. As plantas medicinais são aquelas capazes de aliviar ou curar enfermidades e têm tradição de uso como “remédio” em uma população ou comunidade, porém para usá-las de forma segura, é preciso conhecer a planta e saber onde colhê-la e como prepará-la, pois as mesmas são utilizadas na sua forma “natural”, ou seja, sem sofrer nenhum processo de industrialização, no entanto, o uso de forma empírica e sem o devido conhecimento prévio pode ser bastante perigoso (BRASIL, 2009).

A comercialização de plantas medicinais é basicamente realizada em lojas de produtos naturais, na grande maioria das situações não possuem certificação de qualidade, sendo comercializadas com a promessa de “benefício” atrelado ao fato de se tratar de um “produto natural”. Contudo, na maioria das vezes, as propriedades farmacológicas prometidas não passam de mero artefato cultural, sem validação científica.

Tecnicamente, pouco se sabe sobre a maioria das plantas medicinais para oferecer garantias de uso, o incentivo aos estudos oferece inúmeras vantagens, uma vez que uniformiza as informações com embasamento científico (CALIXTO, 2000). Diante da riqueza natural oferecida pela flora brasileira, a pesquisa com foco em plantas medicinais é uma necessidade, tendo a ciência a missão de buscar as informações respeitando a cultura do povo (ACCORSI, 2000), pois a partir do conhecimento e uso

popular, a medicina tradicional foi apresentada com medicamentos bem importantes, como os salicilatos e digitálicos (BOTSARIS, 1999).

## 2.6 SELAGINELLA CONVOLUTA

A espécie *Selaginella convoluta*, pertence à família Selaginellaceae, que é constituída por um único gênero, Selaginella. Gênero este, que é datado de mais de 300 milhões de anos, não se sabe exatamente quantas espécies a família possui. Alguns autores atribuem 700 espécies, outros, aproximadamente 750 (HIRAI & PRADO, 2000).

A *Selaginella* já foi distribuída em todo o mundo, atualmente possui status de conservação definido como aparentemente seguro (incomum, mas não raro) (RUPA, 2014). É principalmente encontrada na China, Japão, Rússia, EUA, Malásia, Myanmar, Indonésia, Colômbia, Índia, Nepal, Tibete, Butão, Sri Lanka, Cuba, México, Guatemala, Peru, Honduras, Colômbia, Venezuela, Bolívia, Paraguai, Argentina, França e Brasil (RUPA, 2014).

Especificamente no Nordeste brasileiro, a *S. convoluta* é conhecida na região do Vale do São Francisco como “Jericó”, e em outras localidades do como “Mão-fechada” ou “Mão-de-papagaio”. Caracteristicamente é facilmente reconhecida pelo seu hábito em roseta (AGRA et al, 2007), crescem frequentemente nas encostas dos morros e paredões rochosos, mas podem ser também terrestres, ocupando barrancos, rotineiramente em locais secos e expostos ao sol (HIRAI & PRADO, 2000).

Culturalmente, várias propriedades terapêuticas são atribuídas a mesma, sendo uma espécie muito utilizada na medicina popular como afrodisíaco, diurético, contra amenorréia, febres, sangramentos, para aumentar a fertilidade feminina (AGRA et al, 2007; AGRA et al, 2008), bem como analgésico e antiinflamatório (ALMEIDA et al, 2005). Usada também para curar feridas, febre, pneumonia, pedras nos rins, dor de cabeça, hepatite, doenças de pele, dor de dente, diarreia, úlceras gástricas, asma, dores nas costas, purificação do sangue, fadiga, neutralização do veneno das picadas de cobra e escorpião (BATUGAL et al. 2004), antialérgico, hepato-protetor, antiviral, efeitos anticancerígenos (GONÇALVES et al, 2005), antibacteriano (SÁ et al, 2011), antiparasitário (KOLODZIEJ et al, 2005) e leishmanicida (SOUSA et al, 2012).

Estudos relataram que a *S. convoluta* tem potencial terapêutico para o tratamento de desordens dolorosas e que apresenta baixa toxicidade quando avaliado pelo teste da toxicidade aguda (SÁ et al, 2012).

Dentre suas propriedades bioquímicas, destaca-se por apresentar substâncias fenólicas, as quais são responsáveis pela atividade antioxidante *in vitro*, em modelos experimentais, também apresenta biflavonoides (SILVA et al, 1995; LEE et al, 1996), dímeros de flavonoides (LEE et al, 2009), taninos (CHICKMAVATHI et al, 2008), glicosídeos (MAN & THAKSHIKI, 2002 citado por RUPA, 2014) e alcaloides (ZHENG et al, 2004 citado por RUPA, 2014).

*Sellaginella convoluta* tem compostos ativos que podem ser atribuídos a propriedades medicinais, porém faz-se necessário a realização de mais pesquisas correlacionando seus compostos químicos a suas propriedades terapêuticas.

### **3 OBJETIVOS**

#### Objetivo geral

Avaliar *in vitro* a influência da suplementação de extrato de *Selaginella convoluta* em meio de cultura de folículos ovarianos ovinos.

#### Objetivos Específicos

- Classificar os animais por escore corporal;
- Avaliar a morfologia de folículos ovarianos fresco;
- Avaliar a morfologia, crescimento, e viabilidade de folículos ovarianos de ovinos cultivados *in vitro* com extrato de *Selaginella convoluta*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIR R, FISCH B, NAHUN R, ORVIETO E, NITKE S, OKON E, BEN-RAFAEL Z. Turner`s syndrome and fertility: Current status and possible future prospects. *Hum Reprod*, v.7, p.603-610, 2001.
- GRA MF, BARACHO GS, NURIT K, BASILIO IJ, COELHO VP. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “CaririParaibano”, Brazil. *J Ethnopharmacol*. 111(2):383-95. 2007
- AGRA MF, SILVA KN, BASÍLIO IJLD, FREITAS PF, BARBOSA-FILHO JM. Survey of medicinal plants used in the region of Northeast of Brazil. *Braz J Pharmacogn*. 2008;18(3):472-508.
- AKERELE, O.; Herbal Gram 1993, 28, 13ALMEIDA JRGS, MORAES ACA, RIBEIRO RL, GOES RMO, QUINTANS JÚNIOR LJ. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Vale do São Francisco. 1ªReunião Regional da Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais. Livro de resumos. Fortaleza-CE, 2005.
- ACCORSI WR. Medicina natural, um novo conceito. *A fórmula: guia de negócios* ;2(4):5, 2000.
- ANDERSON E; LEE G.Y. The participation of growth factors in simulating the quiescent, proliferative, and differentiative stages of rat granulosa cells grown in a serum-free medium. *Tissue Cell*, v.25, p.49-72, 1993.
- ANDRADE, E.R. et al. Interactions of indole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles. *Theriogenology*, v.64, p.1104-1113, 2005.
- AHERNE, S.A.; O'BRIEN, N.M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and, metabolism. *Nutrition*. New York: v. 18,n. 1, p. 75-81, 2002.
- ANTONIOLLI, C. B; Desenvolvimento Folicular. Seminário apresentado na disciplina de endocrinologia da reprodução do programa de pós-graduação em ciência veterinária, UFRGS, 2002.
- ARECHIGA CG, FLORES SV, ORTIZ O, CÉRON JH, PORRAS A, MCDOWELL LR, HANSEN PJ. Effect of injection of  $\beta$ -carotene or vitamin E and selenium on fertility of lactating dairy cows. *Theriogenology*,v.50, p.65-76, 1998.
- BOTSARIS AS, MACHADO PV. Introdução a fitoterapia. *Memento Terapêutico Fitoterápicos* 1999; 1:8-11.
- BATUGAL, LA, DA SILVA LH, FETT-NETO AG, DE AZEVEDO JR WF, DE MOREIRAIS, PALMA MS, CALIXO JB, ASTOLFI-FILHOS, DOS SANTOS RR, SOARES MB, SANTOS DS. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis and T-cells mediated. 2005. *A Review Mem Inst Oswaldo Cruz* 100.475-506.

- BERTOLINI, M.; BERTOLINI, L.R. Advances in reproductive technologies in cattle from artificial insemination to cloning.. *Rev. Med. Vet. Zoot.* v.56, p. 184-94, 2009.
- BELITZ, H.D.; GROSCH, W. *Química de los alimentos*. Zaragoza: Acribia, p. 645- 656, 1988.
- BEHRMAN HR, KODAMAN PH, PRESTON SL, GAO S. Oxidative stress and the ovary. *J Soc Gynecol Investig*, v.8, p.40-42, 2001.
- BRASIL. Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. Ministério da Saúde - Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos - Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Brasília – DF, 2009.
- BRITO, I.R, SILVA; C.M.G.; DUARTE, A.B.G.; LIMA, I.M.T.; RODRIGUES, G.Q.; ROSSETTO, R.; SALES, A.D.; LOBO, C.H.; BERNUCI, M.P.; ROSA-E-SILVA, A.C.J.S.; CAMPELLO, C.C.; XU M.; FIGUEIREDO, J.R. Alginate hydrogel matrix stiffness influences the in vitro development of caprine preantral follicles. *Molecular Reproduction & Development*. v.81, n.7, p. 636-645, 2014.
- BRUNO J.B. Utilizacao de soro no cultivo in vitro de foliculos pre-antrais caprinos. Dissertacao (Mestrado em Ciencias Veterinarias), Programa de Pos-graduacao em Ciencias Veterinarias, Universidade Estadual do Ceará. Ceará. 66f, 2006.
- BISHONGA C, TAKAHASHI Y, KATAGIRI S, NAGANO M, ISHIKAWA A. In vitro growth of mouse ovarian preantral follicles and the capacity of their oocytes to develop to the blastocyst stage. *J Vet Med Sci*, v.63, p.619-624, 2001.
- BODENSTEINER, K.J. et al. Molecular cloning of de ovine growth/differentiation factor-9 gene and expression of growth differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biol. Reprod*, v.60, p.381-386, 1999.
- BURNS, J. et. al. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. *J. Agric. Food Chemistry*. Chicago: v.49, p. 5797-5808, 2001.
- CALIXTO JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J Med Biol Res* 2000; 33(2):179-89.
- COELHO, M. C. S. C.; SOUZA, V. C.; COELHO, CUNHA, M. P.; MEDINA, F. T. Aspectos sanitários de rebanhos caprinos e ovinos criados em assentamentos no município de Petrolina-PE.\**Revista Semi-árido De Visu*. v.1, n.1, p. 32-40, 2011.
- CHENG G, WEIHUA Z, MAKINEN S, MAKELA S, SAJI S, WARNER M, GUSTAFSSON JA, HOVATTA O. A role for the androgen receptor in follicular atresia of estrogen receptor beta knockout mouse ovary. *Biol Reprod*, v.66, p.77-84, 2002.
- CHANG, H.; BROWN, C.W.; MATZUK, M.M. Genetic analysis of the mammalian TGF- $\beta$  superfamily. *Endocr. Rev*, v.23, p.787-823, 2002.
- CHIKMAWATI T, SETYAWAN AD, MIFTAHUDIN. 2008. Phytochemical constituent of plant extract of Selaginella in Java. 8th Seminary and Congress of Indonesian Plant Taxonomy Association (“PTTI”), Cibinong Science Center, Bogor-Indonesia, 21-23 October 2008.

COUTO, F.A.d'A. & MEDEIROS, J.X. de. Cadeia produtiva de caprinos e ovinos tropicais para carne, no Nordeste e Centro- Oeste do Brasil-Oportunidades e dificuldades. In: XIV Congresso brasileiro de reprodução animal, 2000, Belo Horizonte, Anais. Belo Horizonte, CBRA, 2000.

CORDÃO, M. A. Inclusão de ramos e frutos de jurema preta (*Mimosa tenuiflora*) e farelo de palma forrageira (*Opuntia fícus indica* Mill) e na dieta de cordeiros 2011. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Centro de Saúde e Tecnologia Rural. Universidade de Campina Grande, Paraíba.

COUSE JF, KORACH KS. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev*, v.20, p.358-417, 1999.

COUSE JF, HEWITT SC, KORACH KS. Steroid receptors in the ovary and uterus. In: Neill J.D. (Ed.). *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. San Diego, CA: Elsevier Science, 2006. p.593-678.

CUNNINGHAM, J.G.; KLEIN, B.G.; *Tratado de Fisiologia Veterinária*. 4ª ed. Rio de Janeiro, RJ, Editora: Elsevier, 2008.

CUSHMAN, R.A.; WAHL, C.M.; FORTUNE, J.E.; Bovine ovarian cortical pieces grafted to chick embryonic membranes: a model for studies on the activation of primordial follicles. *Hum. Reprod*, v.17, p.48–54, 2002.

DANFORTH, D.R. et al. Vascular endothelial growth factor stimulates preantral follicle growth in the rat ovary. *Biol. Reprod*, v.68, p.1736-1741, 2001.

DALZIEL JM. *The Useful Plants in West Tropical Africa*, vol. 1. (Crown Agents, London) 1937, 612 .

D'HAESELEER M, SIMOENS P, VAN DEN BROECK W. Ell-specific localization of progesterone receptors in the bovine ovary at different stages of the oestrous cycle. *Anim Reprod Sci*, v.98, p.271-281, 2007

DODE MA, GRAVES CN. Role of estradiol-17 on nuclear and cytoplasmic maturation of pig oocytes. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.99-110, 2003.

DONG, J. et al. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, v.383, p.531-535, 1996.

DRUMMOND AE, FINDLAY JK. The role of estrogens in folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol*, v.151, p.57-64, 1999.

DURÁN, R.M.; PADILLA, R.B. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. *Grasas y Aceites*. Sevilla: v. 44, n.2, p. 101-106, 1993.

FERREIRA, A. Corte: futuro promissor. *AG Leilões*, Porto Alegre, n. 93, p. 16-21, fev. 2006.

FINCH, P.W. et al. Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. *Science*, v.245, p.752-755, 1989.

FILHO, A. N.; ALVES, M. O. Potencialidades da Cadeia Produtiva da Caprinocultura na Região Nordeste do Brasil. Banco do Nordeste do Brasil. Escritório de Estudos Econômicos do Nordeste-ETENE, Abril, 2002.

FORTUNE, J.E. The early stages of follicular development, p. activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci*, v.78, p.135-163, 2003.

GAVA N, CLARKE CL, BYTH K, ARNETT-MANSFIELD RL, DEFAZIO A. Expression of progesterone receptors A and B in the mouse ovary during the estrous cycle. *Endocrinology*, v.145, p.3487-3494, 2004.

GOYENECHÉ AA, CALVO V, GIBORI G, TELLERÍA CM. Androstenedione interferes in luteal regression by inhibiting apoptosis and stimulating progesterone production. *Biol Reprod*, v.66, p.1540-1547, 2002.

GORE-LANGTON R.E, ARMSTRONG D.T. Follicular steroidogenesis and its control. In: Knobil E, Neill JD (Ed.). *Physiology of reproduction*. New York: Raven Press, 1988. v.1, p.331-385.

HREISSON, J.G. et al. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development and survival of human ovarian follicles in organ culture. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, v.87, p.316-321, 2002.

HICKEY TE, MARROCCO DL, GILCHRIST RB, NORMAN RJ, ARMSTRONG DT. Interactions between androgen and growth factors in granulosa cell subtypes of porcine antral follicles. *Biol Reprod*, v.71, p.45-42, 2004.

HUTT, K.; McLAUGHLIN, E.A.; HOLLAND, M.K. KL and KIT have diverse role during mammalian oogenesis. *Mol. Hum. Reprod*, v.12, p. 61-69, 2006.

HULSHOF, S.C.J. et al. Isolation and Characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *Vet Quart*, v.2, n.16, p.78-80, 1994.

ISMAIL, R.S.; DUBE, M.; VANDERHYDEN, B.C. Hormonally regulated expression and alternative splicing of kit ligand may regulate kit-induced inhibition of meiosis in rat oocytes. *Dev. Biol*, v.184, p.333-342, 1997.

JOHNSON AL. Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. *AnimReprodSci*, v.78, p.185-201, 2003.

JOYCE, I.M. et al. Comparison of recombinant growth factor-9 and oocyte regulation of Kit ligand messenger ribonucleic acid expression in mouse ovarian follicles. *Biol. Reprod*, v.63, p.1669-1675, 2000.



KISSEL, H. et al. Point mutation in kit receptor tyrosine kinase reveals essential roles for kit signaling in spermatogenesis and oogenesis without affecting other kit responses. *Embo J*, v.19, p.1312-1326, 2000.

KOOS, R.D. Increased expression of vascular endothelial growth/permeability factor in the rat ovary following an ovulatory gonadotropin stimulus, p. potential roles in follicle rupture. *Biol. Reprod*, v.52, p.1426-1435, 1995.

KORACH KS, EMMEN JMA, WALKER VR, HEWITT SC, YATES M, HALL JM, SWOPE DL, HARRELL JC, COUSE JF. Update on animal models developed for analyses of estrogen receptor biological activity. *J Steroid Biochem Mol Biol*, v.86, p.387-391, 2003.

H, KOLODZIEJ, A.F. KIDERLEN, *Phytochem*.66/17(2005)2056.

KURITA T, LEE K, SAUNDERS PT, COOKE PS, TAYLOR JA, LUBAHN DB, ZHAO C, MAKELA S, GUSTAFSSON JA, DAHIYA, CUNHA GR. Regulation of progesterone receptors and decidualization in uterine stroma of the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Biol Reprod*, v.64, p.272-283, 2001a.

KURITA T, WANG YZ, DONJACOUR AA, ZHAO C, LYDON JP, O'MALEY BW, ISAACS JT, DAHIYA R, CUNHA GR. Paracrine regulation of apoptosis by steroid hormones in the male and female reproductive systems. *Cell Death Differ*, v.8, p.192-200, 2001b.

KOO, H.M.; SUHAILA, M. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *J. Agric. Food Chemistry*. Chicago: v.49, n. 6, p. 3106-3112, 2001.

LEE J, CHOI Y, WOO ER, LEE DG. Isocryptomerin, a novel membrane-active antifungal compound from *Selaginella tamariscina*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;379(3):676-80.

LEE, J. et al. Gonadotropin stimulation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) messenger ribonucleic acid in the rat ovary and the role of PACAP as a follicle survival factor. *Endocrinology*, v.140, p.818-826, 1999.

LEE HS, OH WK, KIM BY, AHN SC, KANG DO, SHIN DI, KIM J, MHEEN TI, AHN JS. 1996. Inhibition of phospholipase C $\gamma$ 1 activity by amentoflavone isolated from *Selaginella tamariscina*. *Planta Med* 62 (4): 293-296.

LIRA, M. A.; FARIAS, I.; SANTOS, M. V. F.; Alimentação de bovinos no Nordeste – Experimentação com forrageiras e pastagens; in: Simpósio Nordestino de Alimentação de Ruminantes; João Pessoa – PB; 1990; Anais.

MAO, J. et al. Effect of EGF and IGF-1 on porcine preantral follicular growth, antrum formation, and stimulation of granulosa cell proliferation and suppression of apoptosis in vitro. *J. Anim. Sci*, v.82, p.1967-1975, 2004.

MAYERHOFER, A. et al. A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology*. v.138, p.3320–3329, 1997.

MARQUES, A. V. M. S.; COSTA, R. G.; SILVA, A. M. A.; PEREIRA FILHO, J. M.; LIRA FILHO, G. E.; SANTOS, N. M.; Rendimento, composição tecidual e musculabilidade da carcaça de cordeiros Santa Inês alimentados com diferentes níveis de feno de flor-de-seda na dieta; *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v.3, n.1, p.85-89, 2007.

MARKSTRÖM E, SVENSSON EC, SHAO R, et al. Survival factors regulating ovarian apoptosis – dependence on follicle differentiation. *Reproduction*, v. 123, p. 23-30, 2002.

MARTINS, F. S. et al. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. *Rev. Bras. Repr. Anim.* v.32, n.1, p.36-49, 2008.

BARBERINO RS, BARROS VRP, MENEZES VG, SANTOS LP, ARAÚJO VR, QUEIROZ MAA, MATOS MHT, ALMEIDA JRGS AND PALHETA JRRC. Amburanacearensis leaf extract maintains survival and promotes in vitro development of ovine secondary follicles. *Zygote*: page 1 of 9 c Cambridge University Press 2015a.

MATOS, M.H.; LIMA-VERDE, I.B.; LUQUE, M.C.; MAIA, J.E.; SILVA, J.R.; CELESTINO, J.J.; MARTINS, F.S.; BÁO, S.N.; LUCCHI, C.M.; FI-GUEIREDO J.R. Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability in vitro. *Zygote*, v.15, n.2, p. 173-182, 2007.

MATOS, MHT; BARBERINO, RS; BARROS, VRP; MENEZES, VG; SANTOS, LP; ARAÚJO, VR; QUEIROZ, MAA; ALMEIDA, JRGS AND PALHETA, JRRC. (2015a). Amburanacearensis leaf extract maintains survival and promotes in vitro development of ovine secondary follicles. Cambridge University Press, *Zygote*: 1-9

MATOS, MHT; GOUVEIA, BB; BARROS, VRP; GONÇALVES, RJS; BARBERINO, RS; MENEZES, VG; LINS, TLB; MACEDO, TJS; SANTOS, JMS; ROLIM, LA, ROLIMNETO, PJ; ALMEIDA, JRGS. (2015b). Effect of ovarian tissue transportation in Amburanacearensis extract on the morphology and apoptosis of goat preantral follicles. *Anim. Reprod*, Belo Horizonte, v.12, n.2, 316-323.

MELO, E.A.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. *Bol.SBCTA*. Campinas: v.36, n. 1, p. 1-11, 2002.

MINGOTI GZ, GARCIA JM, ROSA-E-SILVA AA. The effect of serum on in vitro maturation, in vitro fertilization and steroidogenesis of bovine oocytes co-cultured with granulosa cells. *Braz J Med Res*, v.28, p.213-217, 1995.

MOUDGAL NR, SHETTY G, SELVARAJ N, BHATNAGAR AS. Use of a specific aromatase inhibitor for determining whether there is a role for oestrogen in follicle/oocyte maturation, ovulation and preimplantation embryo development. *J Reprod Fertil Suppl*, n.50, p.69-81, 1996.

MULAC-JERICEVIC B, LYDON JP, DEMAYO FJ, CONNEELY OM. Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor-B isoform. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.100, p.9744-9749, 2003.

MULAC-JERICEVIC B, MULLINAX RA, DEMAYO FJ, LYDON JP, CONNEELY OM. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science*, v.289, p.1751-1754, 2000.

MURAYAMA, C.; MIYAZAKI, H.; MIYAMOTO, A.; SHIMIZU, T. Luteinizing hormone (LH) regulates production of androstenedione and progesterone via control of histone acetylation of StAR and CYP17 promoters in ovarian theca cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 350, n.1, p. 1-9, 2012.

NELSON LR, BULUN SE. Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol*, v.45, p.116-124, 2001.

NORDBERG J, ARNÉR ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*, v.31, p.1287-1312, 2001.

PELLICER A. Oestrogens and follicular and oocyte development. *Hum Reprod Update*, v.3, p.93-94, 1997.

QUIRK SM, COWAN RG, HARMAN RM. Progesterone receptor and the cell cycle modulate apoptosis in granulosa cells. *Endocrinology*, v.145, p.5033-5043, 2004.

RACHID, M.A.; VASCONCELOS, A.C.; NUNES, V.A. Apoptosis in the lymphoid depletion induced by T-2 toxin in broiler chicks. Histomorphometry of the bursa of Fabricius. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.52, 2000.

ROBERTS, R.D.; ELLIS, R.C.L.; Mitogenic effects of fibroblast growth factors on chicken granulosa and theca cells in vitro. *Biol. Reprod*, v.61, p.1387-92, 1999.

SAUMANDE, J. Ovogenèse et folliculogenèse. *Rec. Méd. Vét*, v.157, p.29-38. 1981.

REDMER, D.; REYNOLDS, L. Angiogenesis in the ovary. *Biol. Reprod*, v.1, p.182-192, 1996.

RODRIGUES G.Q, SILVA C.M.G, FAUSTINO L.R, BRUNO J.B, PINTO L.C, LOPES C.A.P, CAMPELLO C.C, FIGUEIREDO J.R. Efeito de diferentes concentrações de hormôniofolículo-estimulante recombinante sobre o desenvolvimento in vitro de folículos pré-antraiscaprinos e ovinos isolados. *ActaVeterinariaBrasilica*, v.4, n.3, p.144-152, 2010.

ROSANOVA, C. Fatores favoráveis e limitantes ao desenvolvimento da cadeia produtiva da Ovinocaprinocultura de corte no Brasil. 2004. Monografia (Especialização em Estão Agroindustrial) – Departamento de administração e Economia da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

RUPA, P.; LAKSHMIBHAVANI N. Diversidade, Conservação S tatus e Medicinal Importância da *Selaginella* spp. Associação Internacional de Congressos Ciência [www.isca.in](http://www.isca.in),

SAUMANDE, J. Ovogenèse et folliculogenèse. Rec. Méd. Vét, v.157, p.29-38. 1981.

SÁ PGS, GUIMARÃES AL, OLIVEIRA AP, SIQUEIRA FILHO JÁ, FONTANA AP, DAMASCENO PKF, BRANCO CRC, BRANCO A, ALMEIDA J RG. S.Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de Selaginella convoluta (Arn.) Spring (Selaginellaceae). Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v. 33, n.4, p.561-566, 2012.

SÁ, MCA, PEIXOTO, RM, KREWER, CC, ALMEIDA, JRGS, VARGAS, AC, COSTA, MM. Antimicrobial activity of caatinga biome ethanolic plant extracts against gram negative and positive bacteria. Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos do bioma Caatinga contra bactérias gram-negativas e positivas. R. bras. Ci. Vet, v. 18, n. 2/3, p. 62-66, maio/dez. 2011

SILVA GL, CHAI H, GUPTA MP, ET AL. Cytotoxic bioflavonoids from Selaginella willdenowii. Phytochemistry. 1995;40:129-134.

SILVA GL, CHAI H, GUPTA MP, FARNSWORTH NR, CORDELL GA, PEZZUTO JM, BEECHER CW, KINGHORN AD. 1995. Cytotoxic biflavonoids from Selaginella willdenowii. Phytochem 40 (1): 129-13.

SILVA LS. Hormônios da glândula adrenal. Seminário apresentado na disciplina bioquímica do tecido animal, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. RS, 2005.

SELLAPPAN, S.; AKOH, C.C.; KREWER, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. J. Agric. Food Chemistry, Chicago: v.50, n. 8, p. 2432-2438, 2002.

SHIMASAKI, S. et al. The role of bone morphogenetic proteins in ovarian function. Reproduction, v.61, p.323-337, 2003.

SILVA, J.R.V. et al. The activin-follistatin system and in vitro early follicle development in goats. J. Endocrinol, v.189, p.113-125, 2006

SILVA, CMG, FAUSTINO, LR, SARAIVA, MVA, ROSSETTO, R, FIGUEIREDO, JR. Influência da tensão de oxigênio na maturação oocitária e cultivo in vitro de folículos e embriões. Zygote 24 (April), pp. 277-285. Cambridge University Press 2015

SILVA SOBRINHO, A. G.; MORENO, G. M. B.; Produção de carne ovina e caprina e cortes da carcaça; UNESP, Jaboticabal – SP; 2009.

SILVA, V. B.; ZUCCARI, C.E.S.N.; COSTA E SILVA, E.V.; Fatores de crescimento envolvidos no desenvolvimento de folículos pré-antrais; Veterinária em Foco. Canoas. v.8 n.2 p.121-131 jan./jun. 2011.

SILVA, G.M.; ARAÚJO, V.R.; DUARTE, A.B.G.; LOPES, C.A.P.; FIGUEIREDO J.R.. Papel dos antioxidantes no cultivo *in vitro* de células ovarianas Rev. Bras. Reprod. Anim, Belo Horizonte, v.35, n.3, p.315-326, jul./set. 2011. Disponível em [www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br)

SHIH, M.C.M.; CHIU, Y.N.; HU, M.C.; GUO, I.C.; CHUNG, B.C. Regulation of steroid production: analysis of Cyp11a1 promoter. Molecular and Cellular Endocrinology, v. 336, p.80–84, 2011.

SKINNER, M.K. Regulation of primordial follicle assembly and development. Hum. Reprod. Update, v.11, p.461-471, 2005.

SO-YOUNG, S. et al. Protective effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) in frozen-thawed granulosa cells is mediated by inhibition of apoptosis. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol, v.125, p.233-238, 2006.

TANIGUCHI F, COUSE JF, RODRIGUEZ KF, EMMEN JMA, POIRIER D, KORACH KS. Estrogen receptor- $\alpha$  mediates an intraovarian negative feedback loop on thecal cell steroidogenesis via modulation of Cyp17 $\alpha$ 1 (cytochrome P450, steroid 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20 lyase) expression. FASEB J, v.21, p.586-595, 2007.

TELEFO, PB, TAGNE1, SR, KOONA1, OES, YEMELE, DM, TCHOUANGUEP, FM. (2012). Effect of the aqueous extract of *Justicia insularis* t. Anders (acanthaceae) on ovarian folliculogenesis and fertility of female rats. Afr J Tradit Complement Altern Med, 9(2)197-203

TELFER, E.E. The development of methods for isolation and culture of preantral follicles from bovine and porcine ovaries. Theriogenology, v.45, p.101-110, 1996.

THOMPSON KE, SIPES IG, GREENSTEIN BD, HOYER PB. 17 $\beta$ -estradiol affords protection against 4-vinylelohexene diepoxide-induced ovarian follicle loss in Fischer-344 rats. Endocrinology, v.143, p.1058-1065, 2002.

TOMIC D, FRECH MS, BABUS JK, SYMONDS D, FURTH PA, KOOS RD, FLAWS JA. Effects of ER $\alpha$  overexpression on female reproduction in mice. Reprod Toxicol, v.23, p.317-325, 2007.

THOMAS, F. H.; ARMSTRONG, D. G.; TELFER, E. E. Activin promotes oocyte development in ovine preantral follicles in vitro. Reprod. Biol. Endocrinol. v.1, p.76, 2003.

VAN WEZEL, I.L. et al. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in bovine ovarian follicles. Mol. Cell Endocrinol, v.115, p.133-140, 1995.

WANDJI, S.; FORTIER, M.A.; SIRARD, M. Differential response to gonadotrophins and prostaglandin E2 in ovarian tissue during prenatal and postnatal development in cattle. Biol. Reprod, v.46, p.1034-1041, 1992.

WEI LL, MINER R. Evidence for the resistance of a third progesterone receptor protein in human breast cancer line T47D. Cancer Res, v.54, p.340-343, 1994.

WETHERINGTON, J. Introduction to Biotechnology: A Georgia Teachers Resource Manual. 2010, 87p.

YAMAMOTO, S. et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) during folliculogenesis and corpus luteum formation in the human ovary. *Gynecol. Endocrinol*, v.11, p.371–381, 1997.

YANG, M.Y.; FORTUNE, J.E. Vascular endothelial growth factor stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles in vitro. *Mol. Reprod. Dev*, v.74, p.1095-1104, 2007.

ZHAO, J. et al. Effect of activin A on in vitro development of rat preantral follicles and localization of activin A and activin receptor II. *Biol. Reprod*, v.65, p.967-977, 2001.

ZHOU, J. et al. Selective expression of insulin-like growth factor system components during porcine ovary follicular selection. *Endocrinology*, v.137, p.4893-4901, 1996.

ZHOU, H.; ZHANG, Y. Effect of growth factors on in vitro development of caprine preantral follicle oocytes. *Anim. Reprod. Sci*, v.90, p.265-272, 2005.

ZHONG, Y.; KASSON, B.G. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates steroidogenesis and adenosine 3, 5-monophosphate accumulation in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, v.135, p.207-213, 1994.

## 5. Capítulo 1

### **INTER-RELAÇÃO ENTRE ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL E RESERVA OVARIANA EM FÊMEAS OVINAS**

Revorêdo, R.G.<sup>a,b</sup>; Silva, D.M.F.<sup>a</sup>; Batista, A.M.<sup>a</sup>; Oliveira, M.A.L.<sup>a</sup>; Wischral, A.<sup>a\*</sup>

*<sup>a</sup>Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, 52171-900, Pernambuco, Brasil.*

*<sup>b</sup>Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO, Brasil.*

**\*Autor correspondente:** A. Wischral, Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE. CEP: 52171-900, Brasil. Tel: +55 81 3320 6413, Fax: 3320 6057. E-mail:aurea.wischral@gmail.com.

## RESUMO

Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos do escore de condição corporal sobre a reserva ovariana em ovelhas. Um total de 10 ovelhas foram avaliadas quanto à escore de condição corporal, parâmetros clínicos, hematológicos, parasitológicos e reserva ovariana. O exame físico foi realizado pré-abate e amostras de sangue e ovários dessas ovelhas foram coletados durante o abate, posteriormente os ovários foram processados sob técnica histológica (H-E). Os animais com EC 3 e 4/5 apresentaram maior reserva ovariana e menor grau de degeneração independente da categoria folicular ( $P < 0,05$ ), quanto a ativação, não houve diferença entre os grupos testados ( $P > 0,05$ ). Após análise, conclui-se que animais com escore corporal acima de 3 apresentam melhor reserva ovariana.

**Palavras-chave:** Metabolismo, folículo, ovelhas.

## Introdução

A ovinocaprinocultura é uma atividade econômica explorada mundialmente, e no Brasil apresenta relevante papel, pois gera oportunidade de emprego, renda e, conseqüentemente, fixação do homem no campo (FILHO, 2002).

O Nordeste conta com um plantel de mais de 50% do rebanho nacional de ovinos, porém apesar de grande, o rebanho possui índices de produtividade, produção e rentabilidade baixos (SILVA SOBRINHO & MORENO, 2009), a produção ainda está basicamente direcionada para a subsistência (FERREIRA, 2006). Além disso, ovinos agregam grande valor social por adaptar-se às variações de clima (CORDÃO, 2011).

Vários fatores, como composição genética, patologias clínicas e nutricionais foram identificadas como itens responsáveis pela limitação produtiva (ARREGUM et al, 1997). Há relatos de inibição da função reprodutiva por estresses nutricional, pois neste período o organismo prioriza a demanda energética para processos indispensáveis à manutenção da vida, e diante do fato, de forma aguda, a síntese e liberação do GnRH e LH é reduzida afetando a taxa de ovulação (KRIEGSFELD et al, 2006).

Pesquisa em bovinos tem revelado que extremos nutricionais estão associados ao aumento da infertilidade, distúrbios hormonais, resistência a insulina, ausência de



ovulação ou a desfechos gestacionais inadequados (SOUZA et al, 2014). Ovelhas subalimentadas com balanço energético negativo apresentam influência negativa sobre a foliculogênese (MEIKLE et al, 2018). Reservas corporais ideais garantem uma regulação nos níveis energéticos e este maior eficiência reprodutiva (CEZAR E SOUZA, 2006).

Sendo assim, este estudo foi realizado com o objetivo de investigar as relações entre condições nutricionais e reserva ovariana em ovelhas.

## **Material e Métodos**

Todos os produtos químicos e reagentes foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA), salvo indicação em contrário. A aprovação do comitê de ética não foi necessária, uma vez que a investigação envolveu tecidos de animais oriundos de abatedouro.

### *Área de estudo*

O estudo foi realizado no estado de Pernambuco, Brasil (8°19'59'' S e 37°45'0'' O), as amostras procederam de abatedouro público municipal e foram colhidas no período de Fevereiro a Dezembro de 2018 e analisadas na Universidade Federal Rural de Pernambuco.

### *Seleção de Animais*

No aprisco destinado à chegada e seleção dos animais no abatedouro, foram selecionadas, aleatoriamente, 10 fêmeas ovinas, mestiças, em idade reprodutiva.

### *Avaliação dos animais*

Com os animais descansados do trajeto da propriedade ao abatedouro, em situação de conforto térmico, jejum alimentar de aproximadamente 8h e dieta hídrica liberada, foi realizado exame físico segundo metodologia descrita por Radostitis (2000).

### *Determinação de escore corporal*

Após avaliação clínica dos animais, determinou-se o escore corporal. Para a classificação utilizou-se o método de avaliação visual e palpação, do grau da cobertura muscular e da cobertura adiposa da região lombar dos animais, com atenção a deposição de gordura e à musculatura nas vértebras. O escore corporal (EC) para ovinos varia de 1 a 5, onde o escore 1 representa condição corporal pobre, situação em que as apófises espinhosas e as apófises transversas são facilmente sentidas na palpação e no escore 5 há deposição excessiva de gordura, que impede a palpação das apófises

(RUSSEL, 1984<sup>a,b</sup>).

#### *Coleta de fezes e sangue*

As amostras de fezes (30g) foram coletadas de cada ovelha durante o exame físico, as amostras de sangue (4 mL) foram coletadas da veia jugular durante a sangria. Após a coleta, as amostras foram transferidas para o laboratório a 4 °C e destinadas a realização de exame parasitológico e hemograma, respectivamente (HENDRIX, 2005).

#### *Coleta dos ovários*

Imediatamente após o abate, os ovários esquerdo e direito (n = 20) foram excisados e submetidos à lavagem em solução salina (0,9% NaCl), seguido de lavagem em Meio Essencial Mínimo (MEM) acrescido de HEPES (MEM HEPES), contendo solução antibiótico/antimicótico (Ab/Am, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina e 0,25 µg/mL anfotericina B; Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) e posteriormente colocados em tubos contendo MEM HEPES e transportados ao laboratório em temperatura de 4 °C.

#### *Análise histológica*

No laboratório, foram retirados os ligamentos e tecido adiposo que envolvia

os ovários e amostras de tecido do córtex ovariano (aproximadamente 3x3x2 mm) foram obtidas com auxílio de lâminas de bisturi sob condições estéreis. Um fragmento de cada ovário coletado foi imediatamente fixado em formalina a 10% para análise histológica segundo técnica descrita por GOUVEA (2015). Brevemente, os fragmentos fixados em formalina tamponada a 10%, foram desidratados numa série gradual de etanol, clarificados com xileno e incluídos em cera de parafina. Posteriormente, os blocos de parafina foram cortados com micrótomo em espessura de 5 µm, os cortes foram montados em lâminas, corados com Hematoxilina-Eosina e examinados em microscópio óptico (Olympus BX50, Japão) sob aumento de 40X. Os folículos foram cuidadosamente contados uma vez, (CELESTINO et al, 2009), cada folículo foi examinado em cada secção que apareceu e combinou com o mesmo folículo nas secções adjacentes para evitar a contagem dupla e, portanto, garantir que cada folículo foi contado apenas uma vez, independentemente do tamanho.

A classificação dos folículos foi avaliada de acordo com o descrito por Bertoldo et al. (2014), considerando como primordiais os folículos que apresentaram oócito esférico ou ovoide, rodeado por uma camada simples de

células da granulosa achatadas ou pavimentosas; de transição com pelo menos uma célula da granulosa com o formato cúbico; primários com uma única camada de células da granulosa cúbicas em torno do oócito e secundários apresentando oócito circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa cúbicas. Considerou-se como folículos ativados os classificados como transição, primário e secundário, e reserva ovariana, apenas os classificados como primordiais ou não ativados.

Os folículos foram ainda classificados como normais ou degenerados, baseando-se na avaliação do núcleo e citoplasma das células da granulosa e dos oócitos, segundo Silva et al. (2004). O crescimento foi avaliado pela mensuração dos diâmetros do folículo e do oócito, em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ), sendo calculados a partir da média de duas medidas perpendiculares, realizadas em programa computacional de análise de imagens - Image J (Fiji 1.46) (FERREIRA et al, 2012).

#### *Avaliação da reserva ovariana*

Para as condições experimentais os animais foram agrupados ( $n=3$ ) por categoria de escore corporal (Grupo 1/2: composto por animais com escore corporal 1 e 2; Grupo 3: composto por animais com escore corporal 3 e Grupo

4/5: composto por animais com escore corporal 4 e 5), que foram relacionadas com a quantidade e qualidade de folículos presentes nos ovários.

#### *Análise estatística*

Os dados de ativação folicular (primordial/desenvolvimento) e morfologia (normal/degenerado) foram submetidos ao teste exato de Fischer e apresentados em percentuais. Valores foram considerados significativos quando  $P < 0,05$ .

#### **Resultados**

Não foi observado diferença significativa ( $P > 0,05$ ) nos parâmetros de exame físico, todos os animais apresentaram condições de mucosa, pelagem e abdômen sem alterações, bem como não houve diferença nos demais parâmetros laboratoriais quando comparados os 3 grupos analisados (Tabela 1).

Nosso resultado mostra que os animais classificados com escore corporal 3 e 4/5 apresentaram maior reserva ovariana comparado à análise histológica dos ovários dos animais com escore corporal 1/2 ( $P < 0,05$ ) (Fig. 1 e 2).

De acordo com a Figura 4, nenhuma diferença significativa ( $P > 0,05$ ) foi observada na porcentagem de folículos em crescimento (transição e primários) na

comparação entre os 3 grupos. Entretanto, ao analisarmos apenas o rendimento médio dos folículos totais ou apenas os normais pertencentes aos 3 grupos testados, os

animais com escore corporal 3 e 4/5 apresentaram maior percentual de folículos primordiais ( $P < 0,05$ ) (Fig. 2 e 3).

TABELA 1: Determinação dos parâmetros físico, laboratorial e reserva ovariana.

EC	FC	FR	MR	T	HM	HT	LC	PRS	TF	%	%	%
	(mpm)	(mpm)	(mp5')	(°c)						TFN	TFD	ATV
1/2	75,3 (±1,1)	17,3 (±0,6)	8	39,7 (±0,6)	10,1 (±2,4)	34 (±10,2)	7,8 (±1,9)	neg.	23 (±4)	44 <sup>a</sup>	56 <sup>a</sup>	45,7
3	75,3 (±2,3)	15 (±2)	8,6 (±1,1)	39,3 (±1,1)	10,8 (±4,5)	41 (±5,6)	7,6 (±3,0)	neg.	99 (±8,4)	92 <sup>b</sup>	8 <sup>b</sup>	43,2
4/5	75 (±6,2)	18,2 (±1,2)	8 (±1,6)	39,5 (±1)	8 (±1,9)	37 (±10,6)	8,7 (±2,1)	neg.	29 (±18,5)	89 <sup>b</sup>	11 <sup>b</sup>	34,2

\*valores expressos em média e desvio padrão. EC: Escore Corporal; FC: Frequência Cardíaca; FR: Frequência Respiratória; MR: Movimentos Runinais; MUC: Mucosas; PP: Pele e Pelagem; ABD: Abdomen; T: Temperatura; HM: Hemácias; HT: Hematócrito; LC: leucócitos totais; PRS: Parasitológico de Fezes; TF: Total de Folículos; TFN: Total de Folículos Normais; TFD: Total de Folículos Degenerados; ATV: Total de Folículos Ativos.

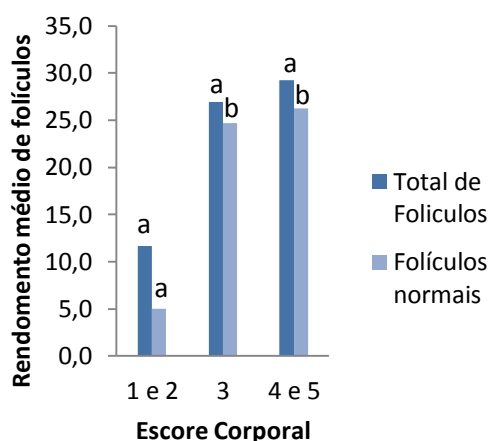


FIGURA 1: Rendimento médio de folículos de acordo com a categoria escore corporal. As letras diferentes denotam diferenças significativas entre os escores corporais ( $P < 0,05$ ).

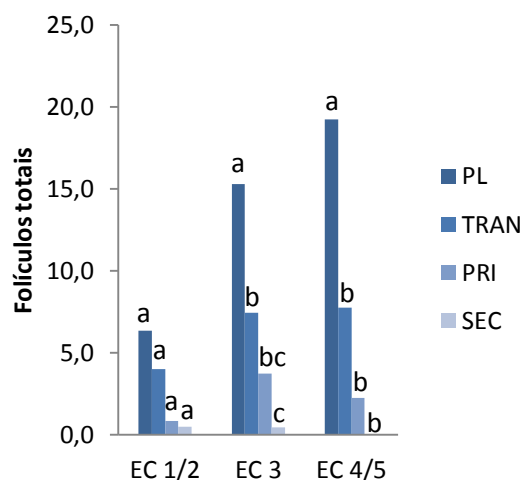


FIGURA 2: Total de folículos de acordo com a categoria de classificação. PL: folículos primordiais; TRAN: folículos em transição; PRI: folículos primários; SEC: folículos secundários. As letras diferentes denotam diferenças significativas entre os escores corporais ( $P < 0,05$ ).

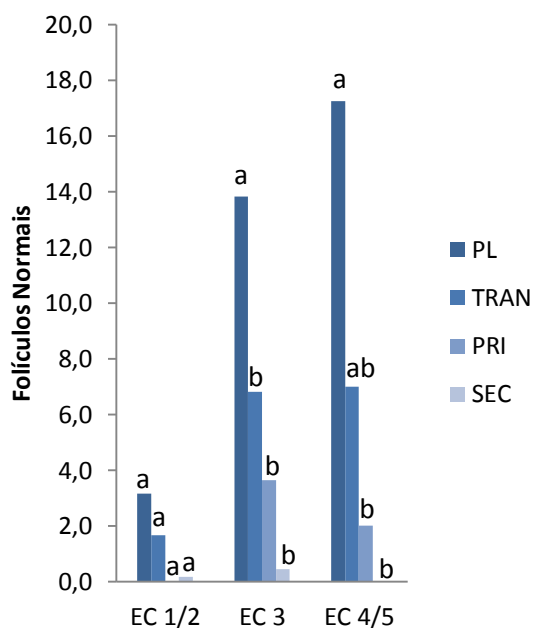


FIGURA 3: Total de folículos normais de acordo com a categoria de classificação. PL: folículos primordiais; TRAN: folículos em transição; PRI: folículos primários; SEC: folículos secundários. As letras diferentes denotam diferenças significativas entre escores corporais - ( $P < 0,05$ ).

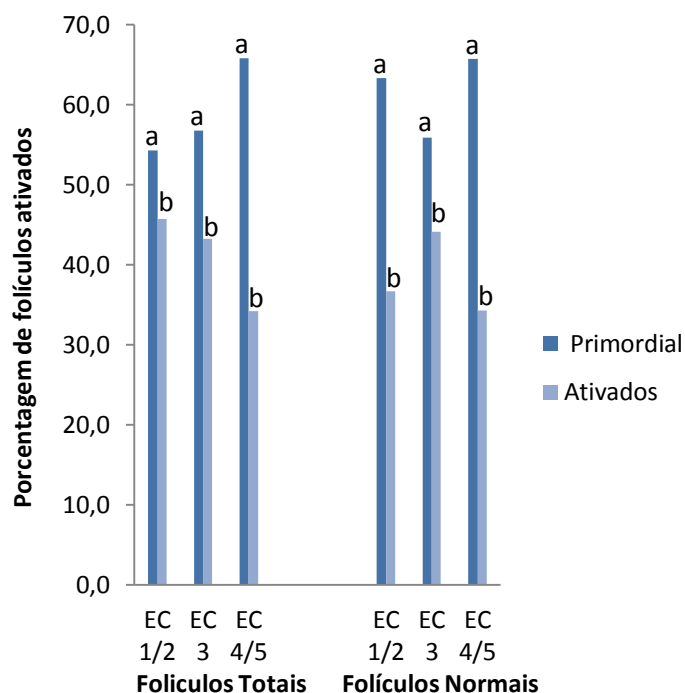


FIGURA 4: Porcentagem de folículos de acordo com a ativação. Foram considerados em ativação: folículos em transição e primários. As letras diferentes denotam diferenças significativas entre os escores corporais ( $P < 0,05$ ).

Quanto a qualidade folicular, comparados entre si, a porcentagem de folículos morfologicamente normais foi maior ( $P < 0,05$ ) nos ovários dos animais classificados com escore corporal 3 e 4/5 e menor grau de degeneração independente da categoria folicular, nos animais com escore corporal 3 (Fig. 1). Em adição, de acordo com a Figura 3 e 5, observou-se diferença significativa ( $P < 0,05$ ), com maior reserva de folículos primordiais normais nos EC 3 e 4/5.

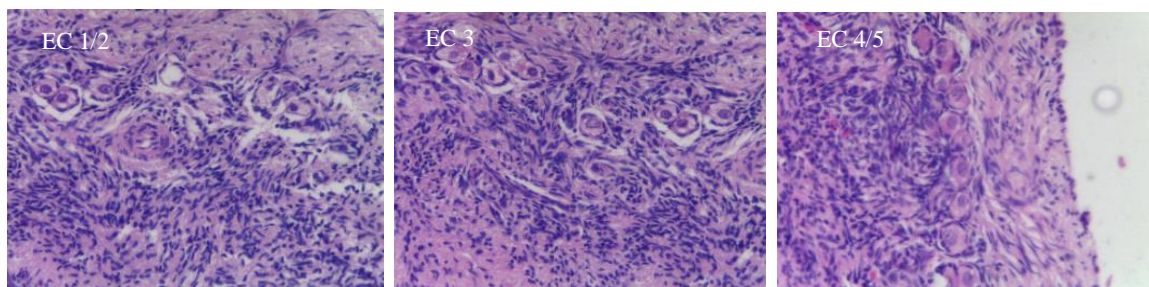


Figura 5: Imagem representativa de cortes histológicos de fragmentos ovarianos ovinos corados com hematoxilina e eosina. Folículos primordiais em diferentes quantidades em animais de diferentes escores corporais.

## Discussão

O termo reserva ovariana caracteriza a quantidade e qualidade de folículos ovarianos primordiais, folículos passíveis de receber estímulo gonadotrófico. Para esta discussão é importante começar refletindo acerca do que define a fertilidade, como avaliar

cl clinicamente e que testes podem auxiliar neste diagnóstico. Análises hormonais como dosagens séricas de FSH e LH, além de avaliação da reserva ovariana são testes utilizados na rotina clínica como parâmetros para avaliação da fertilidade feminina em humanos (D'AVILA, 2013).

Porém, marcadores como a dosagem de LH indica apenas o momento em que há maior chance de engravidar, FSH e inibina B são classificados como tardios. Dosagens hormonais nos fornece uma ideia sobre as chances de uma possível gestação (BURGER et al, 2007), avaliar a fertilidade feminina inclui, além dos parâmetros acima citados, uma série de outros pontos como: a idade, a história clínica e a condição nutricional (D'AVILA, 2013). Até onde sabemos, em animais, poucos estudos correlacionam o efeito da condição corporal sobre a reserva ovariana em fêmeas.

No presente estudo observou-se uma melhor reserva ovariana nos animais pertencentes aos grupos com EC 3 e 4/5. Dentre os fatores que podem afetar esta reserva, podemos citar a idade, a presença de doenças pré-existentes e o estado nutricional. As fêmeas utilizadas neste estudo tinham a mesma faixa etária, adultas e em fase reprodutiva. Contudo, devemos considerar que atrelado à idade inúmeros outros fatores como polimorfismos e históricos infecciosos podem contribuir para diferenças na reserva ovariana de fêmeas na mesma faixa etária (YOUNES, 2011). Além disso, todos os animais foram submetidos à exame clínico e laboratorial para atestar higidez (tabela 1). No entanto, a desnutrição, observada nos animais pertencentes ao grupo 1/2 pode esclarecer esta diferença entre os grupos, pois a desnutrição tem sido relacionada ao declínio hormonal (SOUZA et al, 2014). Dietas ideais habilitam os animais a alcançarem o potencial genético para a reprodução, às respostas neuroendócrinas são refletidas nas concentrações de hormônios e nutrientes circulantes no plasma sanguíneo (MEIKLE et al, 2018).

Outro fato observado neste estudo trata-se do rendimento médio dos folículos totais ou apenas os normais pertencentes aos 3 grupos testados. Os animais com escore corporal 3 e 4/5 apresentaram maior percentual de folículos primordiais, fato justificável pois há momentos em que a taxa de ovulação é particularmente sensível ao fornecimento de nutrientes. Em ovelhas, um destes momentos é cerca de 6 meses antes da monta, quando os folículos ovarianos emergem do pool de folículos primordiais e têm seu crescimento comprometido. Neste momento, a subnutrição reduz a oferta de folículos primordiais que emergem e que estará disponível para ovulação (ALMEIDA, 2007).

Outro efeito da nutrição sobre a função reprodutiva está relacionado ao estresse celular ocasionado pelo déficit nutricional, acelerando a produção de metabólitos deletérios ao folículo e oócito, comprometendo a sobrevivência do mesmo (LEESE, 2002).

No presente estudo nenhuma diferença foi observada na porcentagem de folículos em crescimento (transição e primários) na comparação entre os 3 grupos, porém há relatos que altas concentrações de ácidos graxos não-esterificados (AGNEs), que ocorrem em casos de subnutrição, reduzem a proliferação *in vitro* de células da granulosa (JORRITSMA ET AL. 2004), sendo assim supostamente há inibição do crescimento das células da granulosa (ROOKE ET AL, 2004). Estudos demonstram que restrições nutricionais interferem na taxa de crescimento e no tamanho do folículo dominante e o balanço energético negativo afeta os níveis sistêmicos de IGF (fator de crescimento insulínico), insulina e GH (hormônio do crescimento), e altera a frequência de pulsos de LH, comprometendo o crescimento folicular (PELEGRINO et. al, 2009).

Em contrapartida, o escore corporal alto também é indesejável, pois aumenta os custos nutricionais da produção, traz dificuldades ao parto, eleva a ocorrência de distocias, aumenta as perdas neonatais, reduz o peso ao desmame (GOTTSCHALL, 2005).

A nutrição pode exercer efeito mais importante sobre o folículo do que alguns hormônios, pois concentrações elevadas de leptina, glicose e insulina atuando a nível ovariano produzindo respostas agudas positivas (ALMEIDA, 2007). Atribui-se a leptina a responsabilidade de atuar na indução do ciclo estral, realizando a ligação entre a nutrição e a reprodução; hormônios como GnRH/LH estão correlacionados com uma diminuição no consumo alimentar voluntário em bovinos e esta redução na ingestão parece ser suprimida pela progesterona (GRUMMER et al, 1990). Durante o puerpério, talvez este fato seja melhor observado, pois há maior sensibilidade aos estrógenos e baixos níveis de progesterona endógena, este fato impede a retomada da ciclicidade e pode estar atribuído à nutrição, via leptina (TITOLO et al, 2006).

Quanto à qualidade dos folículos, observou-se mais uma vez que os animais com escore corporal 3 apresentam melhor desempenho, com maior percentual de células normais, concordando com alguns autores que concluíram que fatores nutricionais atuam diretamente sobre o desenvolvimento e qualidade folicular (SOUZA et al, 2014). Em ruminantes, proteínas, gorduras e vitaminas são consideradas responsáveis pelas variáveis reprodutivas, pois a interação entre estas induz ações hormonais, nutricionais e antioxidantes (ALMEIDA, 2007).

Nesse contexto, independentemente da espécie ruminante, há consenso de que a manutenção de um bom escore corporal do rebanho é eficaz para atingir a eficiência produtiva e reprodutiva das matrizes (SIMPLÍCIO e SANTOS, 2005; CEZAR e SOUZA, 2006; MORAES et al, 2007)

Com base nos resultados, conclui-se que animais com escore corporal igual ou maior que 3 apresentam maior reserva ovariana e menor grau de degeneração celular. Sendo assim, investimento na qualidade nutricional da fêmea torna-se uma alternativa interessante e eficiente para colaborar com o sucesso reprodutivo.

## Referências

ALMEIDA, A.P.; SOUZA, A.L.; MENEZES, E.S.B.; ARRUDA, I.J.; RONDINA, D. Recentes avanços na relação entre nutrição e reprodução em ruminantes. **Revista Brasileira de Nutrição Animal**, v.1, n.2, p.34-65, 2007. Disponível em: [http://www.nutricaoanimal.ufc.br/anais/anaisb/aa22\\_01a.pdf](http://www.nutricaoanimal.ufc.br/anais/anaisb/aa22_01a.pdf), acessado em 02/01/2020.

ARREGUM, J.A.A.; SANTOS, R.E.; VILLA-GODOY, A.; ROMÁN-PONCE, H. Dinámica folicular ovárica en vacas Cebú con diferente condición corporal y frecuencia de amamantamiento durante el período anovulatorio posparto. División de Educación Continua, Unam, F.M.V.Z. (Eds.), VII Curso Internacional de Reproducción Bovina. Méx, D.F. 210–240p, 1997. Disponível em: [https://scholar.google.com/scholar?hl=pt-BR&as\\_sdt=0%2C5&q=Din%C3%A1mica+folicular+ov%C3%A1rica+en+vacas+Ceb%C3%BA+con+diferente+condici%C3%B3n+corporal+y+frecuencia+de+amamantamiento+durante+el+per%C3%ADodo+anovulatorio+posparto.+&btnG=](https://scholar.google.com/scholar?hl=pt-BR&as_sdt=0%2C5&q=Din%C3%A1mica+folicular+ov%C3%A1rica+en+vacas+Ceb%C3%BA+con+diferente+condici%C3%B3n+corporal+y+frecuencia+de+amamantamiento+durante+el+per%C3%ADodo+anovulatorio+posparto.+&btnG=), acessado em 02/04/2019.

BURGER HG, HALE GE, ROBERTSON DM, DENNERSTEIN L. A review of hormonal changes during the menopausal transition: focus on findings from the Melbourne Women's Midlife Health Project. *Hum Reprod Update*. 2007 Nov-Dec;13(6):559-65. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmm020>

CELESTINO, JJH, BRUNO, JB, LIMA-VERDE, IB, ET AL. (2010). Steady-State Level Of Kit Ligand Mrna In Goat Ovaries And The Role Of Kit Ligand In Preantral Follicle Survival And Growth In Vitro. *Molecular Reproduction & Development*, 77, P. 231-240.

CEZAR, M. F.; SOUSA, W. H. DE. Avaliação e utilização da condição corporal como ferramenta de melhoria da reprodução e produção de ovinos e caprinos de corte. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43, 2006, João Pessoa, PB. Simpósios. Anais... João Pessoa: SBZ, 2006. p. 649-678. Disponível em: [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=Avalia%C3%A7%C3%A3o+e+utiliza%C3%A7%C3%A3o+da+condi%C3%A7%C3%A3o+corporal+como+ferramenta+de+melhoria+da+reprodu%C3%A7%C3%A3o+e+produ%C3%A7%C3%A3o+de+ovinos+e+caprinos+de+corte+Anais&author=CEZAR+M.+F.&author=SOUSA+W.H.+de&publication\\_year=2006](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Avalia%C3%A7%C3%A3o+e+utiliza%C3%A7%C3%A3o+da+condi%C3%A7%C3%A3o+corporal+como+ferramenta+de+melhoria+da+reprodu%C3%A7%C3%A3o+e+produ%C3%A7%C3%A3o+de+ovinos+e+caprinos+de+corte+Anais&author=CEZAR+M.+F.&author=SOUSA+W.H.+de&publication_year=2006), acessado em: 10/08/2019.



CORDÃO, M. A. Inclusão de ramos e frutos de jurema preta (*Mimosa tenuiflora*) e farelo de palma forrageira (*Opuntia ficus indica* Mill) e na dieta de cordeiros 2011. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Centro de Saúde e Tecnologia Rural. Universidade de Campina Grande, Paraíba. Disponível em: <http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/jspui/handle/riufcg/3546>, acessado: 11/08/2019

D'AVILA, A. M. Avaliação da reserva ovariana em mulheres com cancer de mama submetidas a quimioterapia. Tese de doutorado. Programa de pos-graduação em medicina: Ciências Medicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, 2013. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/76199>, acessado em 01/02/2020.

FERREIRA, A. Corte: futuro promissor. AG Leilões, Porto Alegre, n. 93, p. 16-21, fev. 2006.

FERREIRA, T, RASBAND, W. Image. J. User Guide IJ 1. 46r. (Reviewed by Michael Schmid). 2012.

FILHO, A. N.; ALVES, M. O. Potencialidades da Cadeia Produtiva da Caprinocultura na Região Nordeste do Brasil. Banco do Nordeste do Brasil. Escritório de Estudos Econômicos do Nordeste-ETENE, Abril, 2002. Disponível em: [http://www.nutricaoanimal.ufc.br/anais/anaisc/aa33\\_1.pdf](http://www.nutricaoanimal.ufc.br/anais/anaisc/aa33_1.pdf), acessado 15/08/2019.

GOTTSCHALL, C. S. Produção de novilhos precoces: nutrição, manejo e custos de produção. 2. ed. Guaíba: Agrolivros, 2005. Disponível em: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=AGB.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=239335>, acessado em 05/06/2019.

GOUVEIA, BB, BARROS, VRP, GONÇALVES, RJS, BARBERINO, RS, MENEZES, VG, LINS, TLB, MACEDO, TJS, SANTOS, JMS, ROLIM, LA, ROLIM NETO, PJ, ALMEIDA, JRGS, MATOS, MHT. (2015). Effect Of Ovarian Tissue Transportation In Amburana Cearensis Extract On The Morphology And Apoptosis Of Goat Preantral Follicles. Anim. Reprod, Belo Horizonte, V.12, N.2, 316-323. Disponível em: <https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a6037f7783717068b462b/pdf/animreprod-12-2-316.pdf>, acessado em: 03/06/2019.

GRUMMER,R.R.;; SJ BERTICS , DW LACOUNT , JA SNOW , MR DENTINE , RH ST AUFFACHER. **Indução de estrogênio do fígado gordo em vacas leiteiras** J. Dairy Sci. , 73 ( 1990 ) , pp. 1537 – 1543. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78822-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78822-4)

JORRITSMA, R.; C'ESAR, M.L.; HERMANS, J.T.; KRINTWAGEN, C.L.J.J.; VOS,P.L.A.M.; KRUIP, T.A.M. Effects of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cells and developmental potential of oocytes in vitro. Animal Reproduction Science, v.81, p.225–235, 2004. 33). <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.10.005>

KRIEGSFELD, L.J. et al. Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v.103, n.7, p.2410-2415, 2006. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511003103>

LEESE, H.J. Quiet please, do not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability. *Bioessays* v.24, p.845–849, 2002. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bies.10137>, acessado em: 13/09/2019.

MEIKLE, A.; DE BRUN, V.; CARRIQUIRY, M.; SOCA, P.; SOSA, C.; ADRIEN, M. L.; CHILIBROSTE, P.; ABECIA, J. A. Influences of nutrition and metabolism on reproduction of the female ruminant. 10th International ruminant reproduction symposium (IRRS 2018); Foz do Iguaçu, PR, Brazil. DOI: 10.21451/1984-3143-AR2018-0017

MORAES, J. C. F. de; JAUME, C. M.; SOUZA, C. J. H. de. Manejo reprodutivo da vaca de corte. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, n. 2, p. 160-166, 2007. Disponível em: [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=Manejo+reprodutivo+da+vaca+de+corte&author=MORAES+J.C.F.&author=JAUME+C.M.&author=SOUZA+C.J.H.&publication\\_year=2007&journal=Revista+Brasileira+de+Reprodu%C3%A7%C3%A3o+Animal&volume=31&issue=2&pages=160-166](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Manejo+reprodutivo+da+vaca+de+corte&author=MORAES+J.C.F.&author=JAUME+C.M.&author=SOUZA+C.J.H.&publication_year=2007&journal=Revista+Brasileira+de+Reprodu%C3%A7%C3%A3o+Animal&volume=31&issue=2&pages=160-166), acessado: 03/05/2019.

PELEGRINO, R.C, ANGELO G, PIAZENTIN, K.E. (2009). Anestro ou condições anovulatórias em bovinos. *Revista Científica eletrônica de Medicina Veterinária*. Disponível em: [http://www.faeF.revista.inf.br/imagens\\_arquivos/arquivos\\_destaque/c47Cwc9OpxTfUfP\\_2013-6-19-10-58-11.pdf](http://www.faeF.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/c47Cwc9OpxTfUfP_2013-6-19-10-58-11.pdf), acessado em: 08/08/2019.

RADOSTITS, O. M, et al. *Clínica Veterinária*. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p. 1118-1119.

ROOKE, J.A.; EWEN, M.; MACKIE, K.; STAINES, M.E.; MCEVOY, T.G.; SINCLAIR, K.D. Effect of ammonium chloride on the growth and metabolism of bovine ovarian granulosa cells and the development of ovine oocytes matured in the presence of bovine granulosa cells previously exposed to ammonium chloride. *Animal Reproduction Science* v.84, p.53–71, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.12.005>

RUSSEL AJF 1984a. Means of assessing the adequacy of nutrition of pregnant ewes. *Livestock Production Science* 11: 429–436. [https://doi.org/10.1016/0301-6226\(84\)90054-X](https://doi.org/10.1016/0301-6226(84)90054-X)

RUSSEL A 1984b. Body condition scoring of Sheep. *In Practice* 5: 91–93. Disponível em: [https://ir.library.oregonstate.edu/concern/administrative\\_report\\_or\\_publications/kk91fk644](https://ir.library.oregonstate.edu/concern/administrative_report_or_publications/kk91fk644), acessado em 18/09/2019.

SIMPLÍCIO, A. A.; SANTOS, D. O. Manejo reprodutivo de caprinos e ovinos em regiões tropicais. In: REUNIÃO ANUAL DA SBZ, 42, 2005, Goiânia. Anais... Goiânia: SBZ, EFG, 2005. p. 136-148. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1068895>, acessado em: 19/09/2019.

SILVA, JRV, VAN DEN HURK, R.; MATOS, MHT, SANTOS, RR, PESSOA, C, MORAED, MO, FIGUEIREDO JR. (2004). Influences of FSH and EGF on primordial follicles during *in vitro* culture of caprine ovarian cortical tissue. *Theriogenology*, v. 61,

1691- 1704. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.09.014>

SILVA SOBRINHO, A. G. A.; MORENO, G. M. B. Produção de carnes ovina e caprina e cortes da carcaça. In: SEMINÁRIO NORDESTINO DE PECUÁRIA, 13, 2009, Fortaleza. Anais... Fortaleza: CAEC, 2009. Disponível em: [https://scholar.google.com/scholar?hl=pt-BR&as\\_sdt=0%2C5&q=Produ%C3%A7%C3%A3o+de+carne+ovina+e+caprina+e+cortes+da+carca%C3%A7a.&btnG=](https://scholar.google.com/scholar?hl=pt-BR&as_sdt=0%2C5&q=Produ%C3%A7%C3%A3o+de+carne+ovina+e+caprina+e+cortes+da+carca%C3%A7a.&btnG=), acessado em: 11/04/2019.

SOUZA, M. I. L.; GRESSLER, M. A. L.; URIBE-LELÁSQUEZ, L. F. Interrelationships of nutrition, metabolic hormones and reproduction of female sheep. Revista CES med zoot. 2014; vol.9: 248-261. Disponível em: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1900-96072014000200010&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1900-96072014000200010&script=sci_arttext&tlng=pt), acessado em: 10/01/2020.

YOUNIS JS. Ovarian aging: latest thoughts on assessment and management. Curr Opin Obstet Gynecol. 2011 Dec;23(6):427-34. Doi: 10.1097 / GCO.0b013e32834b92b0

6. Capítulo 2.

**Extrato de *Selaginella convoluta* permite o crescimento e a sobrevivência de folículos pré-antrais ovinos por inibir o estresse oxidativo durante o cultivo *in situ***

Revorêdo, R.G.<sup>a,c</sup>; Silva, D.M.F.<sup>a</sup>; Batista, A.M.<sup>a</sup>; Oliveira, M.A.L.<sup>a</sup>; Almeida, J.R.G.S.<sup>b</sup>; Rodrigues, C.M.S.C.<sup>b</sup>; Teixeira, A.A.C.<sup>c</sup>; Wischral, A.<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>*Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, 52171-900, Pernambuco, Brasil.*

<sup>b</sup>*Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Mediciniais (NEPLAME), Universidade Federal do Vale do São Francisco, 56304-205, Petrolina, Pernambuco, Brasil.*

<sup>c</sup>*Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO, Brasil.*

**\*Autor correspondente:** A. Wischral, Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE. CEP: 52171-900, Brasil. Tel: +55 81 3320 6413, Fax: 3320 6057. E-mail:aurea.wischral@gmail.com.

## RESUMO

*Selaginella convoluta* é uma espécie vegetal popularmente conhecida na região Nordeste do Brasil como jericó, mão de sapo ou mão fechada, e tem sido usada na medicina popular para aumentar a fertilidade feminina, entre outras aplicações. Estudos já mostraram que a planta tem potencial antioxidante, o que pode torná-la um suplemento útil e barato para meios de cultivo celular, onde o processo de oxidação costuma ser um problema. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da adição do extrato etanólico bruto (EEB) de *S. convoluta* no cultivo *in vitro* de folículos inclusos em tecido ovariano ovino. Fragmentos de ovários foram cultivados por 8 dias em  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> suplementado ou não com diferentes concentrações do extrato de *S. convoluta* (0,0; 0,1; 0,2; 0,4 ou 0,8 mg/mL). Depois da cultura, o tecido ovariano foi destinado à análise morfológica (histologia) e pesquisa de espécies reativas ao oxigênio (ROS). Observou-se que houve ativação do crescimento folicular em todas as condições de cultivo, porém, a adição de EEB de *S. convoluta* permitiu maior ativação e menor degeneração dos folículos, principalmente na concentração de 0,8 mg/mL. Observou-se redução de produção de ROS nos cultivos suplementados com EEB de *S. convoluta*. Conclui-se que a suplementação do meio de cultivo celular com EEB de *S. convoluta* apresenta atividade citoprotetora, conservando a morfologia celular, estimulando o desenvolvimento e diminuindo a formação de ROS no cultivo *in situ*.

**Palavras-chave:** Citoproteção; Fenóis; Flavonoides; Jericó; Ovário.

## Introdução

Com o objetivo de aumentar a eficiência produtiva dos rebanhos torna-se importante o desenvolvimento e aplicação de biotecnias. Uma alternativa vem a ser o cultivo *in situ* de folículos ovarianos pré-antrais, técnica que baseia-se na recuperação de folículos pré-antrais presentes no córtex ovariano, seguido de cultivo *in vitro*, a fim de promover crescimento e maturação, produzindo oócitos maduros e competentes

(Figueiredo et al, 2007). Porém, para o sucesso de tal técnica é necessário o uso de sistemas capazes de garantir a sobrevivência folicular (Figueiredo et al, 2010).

Uma constante preocupação científica, nas pesquisas envolvendo reprodução animal, é a manutenção da viabilidade oocitária e, conseqüentemente, a produção bem-sucedida de embriões. Porém, a utilização de técnicas de reprodução assistida tem

enfrentado alguns entraves como: o transporte dos ovários por longas distâncias, a manutenção do aporte energético-nutricional durante o cultivo e, conseqüentemente, a ocorrência de estresse oxidativo (Figueiredo et al, 2011) . Neste contexto, a utilização de algumas estratégias como controle da temperatura e uso de meio de preservação durante o transporte e cultivo do tecido ovariano faz-se necessário.

Nas últimas décadas vários estudos vem investigando a composição ideal do meio de cultura *in vitro* para folículos ovarianos (Gupta et al, 2007). No entanto, para melhorar o desenvolvimento dos oócitos, o meio base comercial precisa ser suplementado com antioxidantes, hormônios e fatores de crescimento (Abedelahi et al, 2010; Andrade et al, 2012).

Com base no descrito acima, apesar de eficaz fonte de nutrientes, o uso de meio de cultivo suplementado é oneroso, fazendo com que outras fontes nutricionais sejam investigadas. O interesse em antioxidantes naturais encontrados em plantas medicinais, que podem contribuir na prevenção de danos celulares oxidativos, vem crescendo constantemente por tratar-se de uma fonte de preservação celular sem grande custo (Rajabi-Toustani et al, 2013). Sendo assim, os compostos naturais vêm se

tornando uma fonte alternativa para meio de cultivo básico.

O avanço nas biotécnicas associadas com plantas medicinais têm se tornado forte aliado para a indústria pecuária, colaborando inclusive com a promoção do desenvolvimento científico e tecnológico em todo mundo (VIEIRA, 2012). O interesse em antioxidantes naturais encontrados em plantas medicinais, que podem contribuir na prevenção de danos celulares oxidativos, vem crescendo constantemente, por tratar-se de fonte de preservação celular sem grande custo (Rajabi-Toustani et al, 2013).

Especificamente pesquisando os efeitos sobre o sistema reprodutivo, extratos de algumas plantas, como por exemplo, *Sterculia tomentosa* (DALZIEL, 1937), *Justicia insularis* (TELEFO et al, 2012) e *Amburana cearensis* (MATOS et al, 2015a; MATOS et al, 2015b), foram testados como suplementação na alimentação animal ou como suplementos nos meios de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos. Os resultados apontam para cura nas desordens reprodutivas, fornecimento de folículos ovarianos competentes, e, em adição, as análises bioquímicas do tecido vegetal demonstram compostos cujos efeitos biológicos regulam funções

reprodutivas, como exemplo alcaloides, fenóis e flavonoides.

Entre as várias espécies de plantas medicinais, *Selaginella convoluta* (Selaginellaceae) chama atenção por seus constituintes químicos (HIRAI & PRADO, 2000). Há relatos da ocorrência de flavonoides, biflavonoides, esteroides e fenóis (LEE et al, 2009; SÁ et al, 2012), substâncias que pressupõem atividade citoprotetora e atuação sobre a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (MACÊDO, 2013; RUIJTERS et al, 2013). Outro fator que merece destaque são as ações terapêuticas popularmente atribuídas a esta espécie, como por exemplo, anti-inflamatória, analgésica, afrodisíaca, antinociceptiva, estrogênica, progesterônica e diurética (AGRA et al, 2008), além de ser utilizada nas terapias para amenorreia, febre, sangramentos, gastrite, hepatite, infecção urinária, hipertensão e aumento da fertilidade feminina (ALMEIDA et al, 2005; AGRA et al, 2007; AGRA et al, 2008).

Pelo exposto, objetivou-se neste estudo investigar os efeitos da adição do extrato etanólico bruto de *Selaginella convoluta* no cultivo *in vitro* de folículos inclusos em tecido ovariano ovino.

## Material e Métodos

Todos os produtos químicos e reagentes foram adquiridos da Sigma

Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA), salvo indicação em contrário. A aprovação do comitê de ética não foi necessária, uma vez que a investigação envolveu tecidos de animais oriundos de abatedouro.

### *Coleta da planta e preparação do extrato*

O material vegetal foi coletado no primeiro trimestre de 2018, na zona rural da cidade de Petrolina, estado de Pernambuco, Brasil (Coordenadas: 09°03'54" e 40°19'12"). A identificação botânica da planta foi realizada por comparação com uma exsicata da planta (6440), depositada no Herbário Vale do São Francisco (HVASF) da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF).

Para preparação do extrato, a planta inteira foi submetida à maceração em etanol 95% até o completo esgotamento do material vegetal. A solução obtida foi submetida à destilação do solvente em evaporador rotatório, sendo obtidos 86 g do extrato etanólico bruto (EEB) de *S. convoluta* (MACÊDO et al, 2018). Todos os procedimentos para o acesso ao patrimônio genético e ao conhecimento tradicional associado foram realizados e o projeto foi registrado no SisGen (Registro nº AF56B5B). Antes do uso como suplemento no meio de cultivo, o EEB de *S. convoluta* foi previamente diluído em dimetilsulfóxido

(DMSO), onde sua concentração final não ultrapassou 1%.

Com o objetivo de investigar as propriedades antioxidantes do EEB de *S. convoluta* a ser utilizado no experimento, o extrato foi submetido à análise dos componentes bioativos no Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Medicinais da Universidade Federal do Vale do São Francisco. Avaliou-se a presença de fenóis (usando o reagente de Folin-Ciocalteu), flavonoides totais (usando método colorimétrico) e a atividade antioxidante do extrato pelos métodos de sequestro do radical livre DPPH e da inibição da autooxidação do  $\beta$ -caroteno, de acordo com metodologia descrita por Macêdo et al. (2018).

#### *Coleta dos ovários*

Ovários (n= 24), de 12 fêmeas ovinas mestiças, escore corporal 3, hígdas, adultas em idade reprodutiva, foram coletados em abatedouro local. Imediatamente após o abate, os pares de ovários foram submetidos à lavagem em solução salina (0,9% NaCl), seguido de lavagem em Meio Essencial Mínimo (MEM) acrescido de HEPES (MEM HEPES), contendo solução antibiótico/antimicótico (Ab/Am, 100 U/mL penicilina, 100  $\mu$ g/mL estreptomicina e 0,25  $\mu$ g/mL anfotericina B; Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, EUA). Os ovários foram

transportados ao laboratório em MEM HEPES à temperatura de 4 °C.

#### *Cultivo in vitro de tecido ovariano*

O cultivo do tecido ovariano baseou-se na técnica descrita por Celestino et al. (2010), com adaptações. No laboratório, foram retirados os ligamentos e tecido adiposo que envolvia os ovários e amostras de tecido do córtex ovariano (aproximadamente 3x3x2 mm) foram obtidas com auxílio de lâminas de bisturi sob condições estéreis. Um fragmento foi imediatamente fixado em formalina a 10% para análise histológica, controle não cultivado (CNC), enquanto cinco outros fragmentos do mesmo ovário foram cultivados por 8 dias.

Os fragmentos foram cultivados individualmente, em placas de cultura de 24 poços contendo 1,5 mL de MEM suplementado com 0,23 mM de piruvato (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, EUA), 2 mM de *L*-glutamina (1x-GlutaMAX™ Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, EUA), 1,25 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), solução de antibiótico-antimicótico (1x), sendo o meio de cultura denominado de  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>. A cultura foi realizada a 39 °C em 5% de CO<sub>2</sub> em incubadora umidificada, sendo o meio de cultivo trocado por meio fresco a cada 2 dias.

Para as condições experimentais, o meio foi suplementado com EEB de *S.*



*convoluta* nas concentrações de 0,1 mg (grupo SC1); 0,2 mg (grupo SC2); 0,4 mg (grupo SC4), 0,8 mg (grupo SC8) ou sem EEB (0 mg - grupo controle - CC).

#### *Análise histológica*

Após o cultivo, os fragmentos foram processados para análise histológica (GOUVEIA et al, 2015). Brevemente, os fragmentos fixados em formalina tamponada a 10%, foram desidratados numa série gradual de etanol, clarificadas com xileno e incluídos em cera de parafina. Posteriormente, os blocos de parafina foram cortados com micrótomo em espessura de 5µm, os cortes foram montados em lâminas, corados com Hematoxilina-Eosina e examinados em microscópio óptico (Olympus BX50, Japão) sob aumento de 40X. Os folículos foram cuidadosamente contados uma vez, conforme realizado em estudos prévios (CELESTINO et al, 2009). Cada folículo foi examinado em cada secção que o folículo apareceu e combinou com o mesmo folículo nas secções adjacentes para evitar a contagem dupla e, portanto, garantir que cada folículo foi contado apenas uma vez, independentemente do tamanho.

A ativação dos folículos foi avaliada de acordo com o descrito por Bertoldo et al. (2014), considerando como primordiais os folículos que apresentaram oócito esférico ou ovoide, rodeado por uma camada simples de

células da granulosa achatadas ou pavimentosas; de transição os folículos com pelo menos uma célula da granulosa com o formato cúbico; primários os folículos com uma única camada de células da granulosa cúbicas em torno do oócito e secundários aqueles apresentando oócito circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa cúbicas. Considerou-se como folículos ativados os classificados como transição, primário e secundário.

Os folículos foram ainda classificados como normais ou degenerados, baseando-se na avaliação do núcleo e citoplasma das células da granulosa e dos oócitos, segundo Silva et al. (2004). O crescimento foi avaliado pela mensuração dos diâmetros do folículo e do oócito, em micrômetros (µm), sendo calculados a partir da média de duas medidas perpendiculares, realizadas em programa computacional de análise de imagens - Image J (Fiji 1.46) (FERREIRA et al, 2012).

Após avaliação estatística dos parâmetros acima citados, selecionou-se as concentrações que forneceram melhor rendimento e qualidade folicular e pesquisou-se a presença de espécies reativas ao oxigênio (ROS) conforme descrito abaixo.

#### *Deteção de ROS in situ*

A deteção de Espécies Reativas ao

Oxigênio (ROS) foi baseada na metodologia descrita por Tsai-Turton & Luderer (2006), com adaptações. Utilizou-se 8 ovários, cultivados como descrito anteriormente e, após o cultivo experimental, os fragmentos de ovários foram incubados por mais 30 minutos, com 100  $\mu\text{mol/L}$  de 5-(e-6)-carboxi-2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (CM-H<sub>2</sub>DCFDA; Molecular Probes, Life Technologies, Eugene, EUA) em  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> a 39 °C e 5% CO<sub>2</sub>. Após a incubação, os fragmentos foram lavados com PBS, fixados em formalina seguido de etanol a 70%, desidratados e finalmente incluídos em parafina. Secções seriadas (5  $\mu\text{m}$ ) foram montadas em lâminas de microscopia, secadas durante à noite a 37 °C, desparafinizada em xilol e hidratada em concentrações decrescentes de etanol. Finalmente as secções foram examinadas e fotografadas com auxílio de microscópio de epifluorescência Leica (Software LeicaLas-AF), modelo DM 5500B, usando filtro L5, espectro de cor Dig. Para cada tratamento, foram analisadas 10 secções do mesmo ovário de quatro diferentes animais, e a intensidade da fluorescência foi medida avaliando a razão entre a área fluorescente e a área total, usando o Software Gimp.

Para as condições experimentais do teste descrito, apenas os grupos SC1, SC8 e CC foram analisados, com base nos resultados obtidos nas análises acima

mencionadas.

#### *Análise estatística*

Os dados morfométricos dos folículos (diâmetro folicular e do oócito) foram submetidos à análise de variância (ANOVA one-way), seguidas pelo teste de múltiplas comparações de Tukey (GraphPad.Prism; versão 5.0; 2007). Quando os dados não foram considerados dentro da normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnoy, os valores foram transformados em logaritmo natural ou raiz quadrada. O diâmetro folicular está apresentado como média  $\pm$  erro padrão. Resultados de ativação folicular (primordial/desenvolvimento) e morfologia (normal/degenerado) foram submetidos ao teste exato de Fischer e apresentados em percentuais. Valores foram considerados significativos quando  $P < 0,05$ . Os dados para detecção de ROS foram submetidos à análise de variância (ANOVA one-way), seguidas pelo teste de múltiplas comparações de Tukey (GraphPad.Prism; versão 5.0; 2007). Quando os dados não foram considerados dentro da normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnoy, os valores foram transformados em raiz quadrada. Valores foram considerados significativos quando  $P < 0,05$ .

#### **Resultados**

A avaliação bioquímica básica do

EEB de *S. convoluta* revelou a presença de fenóis e flavonoides. Pelo uso do método do sequestro do radical livre DPPH o extrato revelou atividade antioxidante superior aos padrões ácido ascórbico (AA), butilhidroxianisol (BHA) e butilhidroxitolueno (BHT) e pelo método da inibição da auto-oxidação do betacaroteno, o extrato revelou atividade antioxidante superior ao padrão ácido ascórbico (AA) (Tabela 1).

Após a cultura, houve significativa redução na porcentagem de folículos primordiais e aumento na porcentagem de folículos em crescimento (transição e primários) em todos os tratamentos comparado aos grupos controle não cultivado e controle

cultivado ( $P < 0,05$ ; Fig. 1). Em adição, o tratamento contendo 0,1 mg/mL e 0,8 mg/mL de *S. convoluta* apresentam porcentual significativamente maior de ativação (transição e primários) comparado aos demais tratamentos ( $P < 0,05$ ; Fig. 1).

Após 8 dias de cultura, a porcentagem de folículos morfologicamente normais foi maior ( $P < 0,05$ ) em todos os tratamentos comparado ao controle cultivado (Fig. 2). Além disso, o tratamento contendo 0,8 mg/mL de *S. convoluta* apresentou menor porcentual de folículos degenerados quando comparado aos demais grupos ( $P < 0,05$ ; Fig. 3).

Tabela 1 – Determinação de Fenóis totais (FT), flavonoides totais (FVT) e atividade antioxidante em extrato etanólico bruto de *S. convoluta* (EEBSC).

Amostra	FT (mgEqAG/g)	FVT (mgEqCAT/g)	DPPH (IC <sub>50</sub> , µg/mL)	β-caroteno (% AA, 1000 µg/mL)
EEBSC	66,33 ± 5,00	631,5 ± 16,77	80,71 ± 8,76	57,00 ± 4,97
BHA	-	-	4,66 ± 0,69	96,43 ± 1,67
BHT	-	-	10,75 ± 0,17	97,5 ± 5,59
AA	-	-	3,44 ± 0,26	2,97 ± 2,36

Para fenóis e flavonoides totais os resultados são expressos em mg de equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de amostra. FT: Fenóis totais; FVT: Flavonoides totais; DPPH: avaliação da redução do radical DPPH ; β-caroteno: determinação da atividade antioxidante por meio do sistema de co-oxidação β-caroteno/ácido linoleico. Controle positivo o padrão ácido ascórbico (AA), butilhidroxianisol (BHA) e butilhidroxitolueno (BHT). EAG= equivalente de ácido gálico; ECAT= equivalente de catequina.

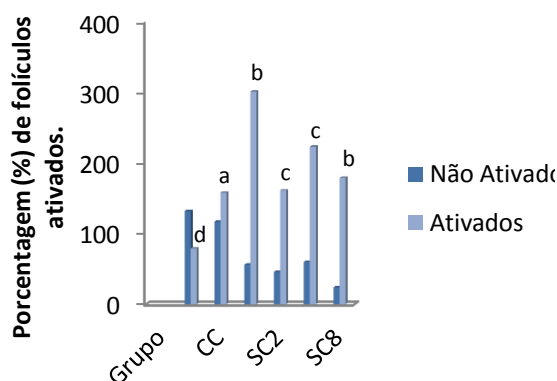


Figura 1: Percentagens de folículos ativados e não ativados de acordo com as diferentes concentrações de EEB de *S. convoluta*. Controle fresco/ não cultivados (CNC), cultivado em MEM (CC) e cultivados em MEM suplementado com diferentes concentrações de EEB de *S. convoluta* (SC1; SC2, SC4 e SC8). As letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ).

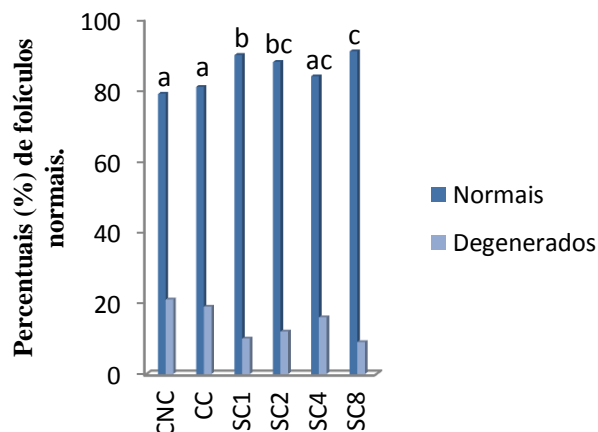


FIGURA 2: Percentuais (%) de folículos normais e degenerados após cultivo em diferentes concentrações de EEB de *S. convoluta*. Controle fresco/ não cultivados (CNC), cultivado em MEM (CC) e cultivados em MEM suplementado com diferentes concentrações de EEB de *S. convoluta* (SC1; SC2, SC4 e SC8). As letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ).

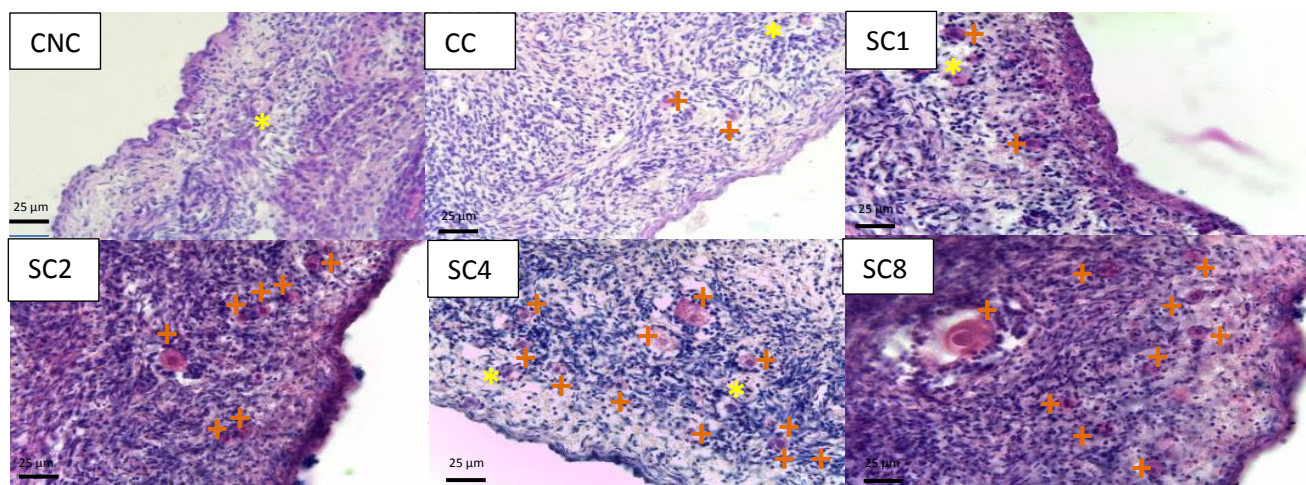


FIGURA 3: Cortes histológicos de fragmentos ovarianos ovinos corados com hematoxilina e eosina, após 8 dias de cultivo. Folículos normais (+) e degenerados (\*).

Nenhuma diferença significativa ( $P > 0,05$ ) no diâmetro folicular e do oócito foi observada entre os tratamentos para as categorias (primordial, transição e primário) após o período de cultura *in vitro*. Entretanto, o diâmetro folicular e do oócito nos folículos secundários foi significativamente maior nos tratamentos com 0,4 e 0,8 mg/mL *S. convoluta* comparado ao controle cultivado ( $P < 0,05$ ; Figuras 4 e 5).

Quanto à presença de ROS no tecido ovariano, foi observado que o tratamento com EEB de *S. convoluta* (0,1 e 0,8 mg/mL) reduziu o percentual de área marcada com DCFDA quando comparado ao grupo controle. Além disso, o tratamento contendo 0,8 mg/mL de *S. convoluta* apresentou menor formação de ROS comparado à concentração de 0,1 mg/mL ( $P < 0,05$ ; Figuras 6 A e B).

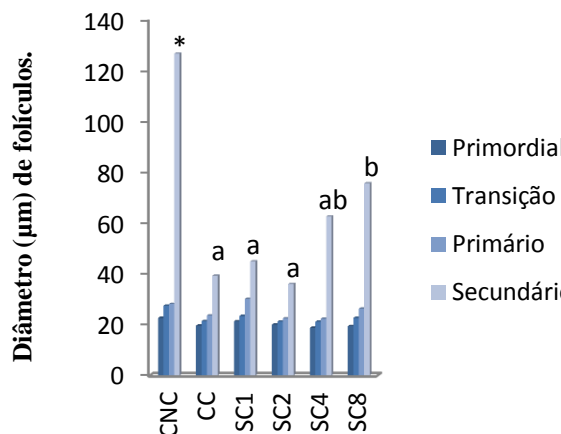


FIGURA 4: Diâmetro de folículos de acordo com a categoria e ativação após cultivo com diferentes concentrações de EEB de *S. convoluta*. Controle fresco/ não cultivados (CNC), cultivado em MEM (CC) e cultivados em MEM suplementado com diferentes concentrações de EEB de *S. convoluta* (SC1; SC2, SC4 e SC8). As letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ).

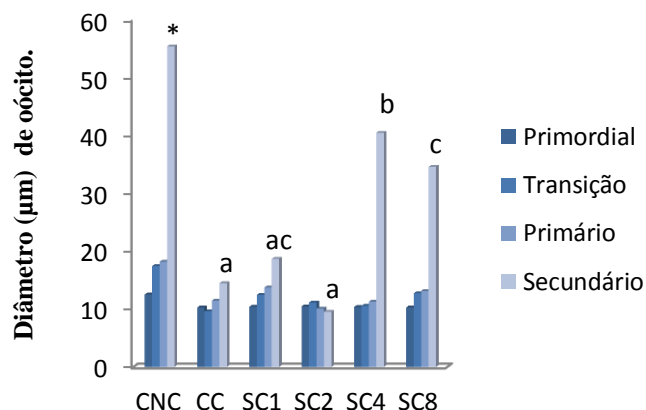


FIGURA 5: Diâmetro de oócito de acordo com a categoria e ativação após cultivo com diferentes concentrações de EEB de *S. convoluta*. Controle fresco/ não cultivados (CNC), cultivado em MEM (CC) e cultivados em MEM suplementado com diferentes concentrações de EEB de *S. convoluta* (SC1; SC2, SC4 e SC8). As letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ).

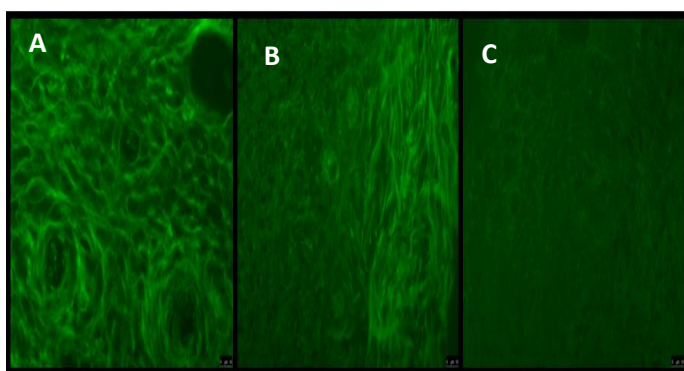
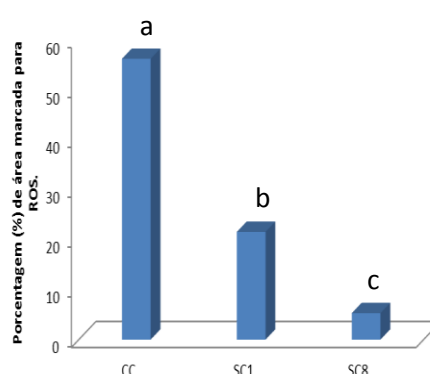


FIGURA 6: (A) Imagens representativas dos níveis de ROS intracelular, (A1) imagem mostra DCF fluorescência em tecido pertencente ao grupo controle cultivado (CC). (A2) e (A3) imagens mostram DCF fluorescência em tecidos pertencente aos grupos tratados com *S. Convoluta* nas concentrações de 0,1 e 0,8 mg/mL, respectivamente. (B) Percentual de área marcada por diacetato de 20,70-diclorofluoresceína (H2DCFDA) (Molecular Probe), para mensurar espécies reativas ao oxigênio (ROS) intracelular, após cultivo *in vitro* de folículos incluídos no tecido ovariano com diferentes concentrações de EEB de *S. convoluta*. Controle cultivado em MEM (CC) e cultivados em MEM suplementado com diferentes concentrações de EEB de *S. convoluta* (SC1 e SC8). As letras diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ).



## Discussão

Este constitui o primeiro estudo a demonstrar o efeito benéfico do extrato de *S. convoluta* no cultivo *in situ* de folículos ovarianos de ovinos. No presente estudo, foi possível identificar e quantificar fenóis totais, flavonoides totais e capacidade antioxidante do extrato etanólico de *S. convoluta*.

Segundo estudo realizado por Macêdo (2019) frações do EEB de *S. convoluta* demonstraram a presença de flavonoides, derivados antracênicos, quinonas, triterpenos e esteroides, agentes já citados como antimutagênicos e anticancerígenos (Castro, 2008; Ugaz, 1993), com propriedades úteis para o desenvolvimento folicular saudável, porém, ainda sem histórico de uso na foliculogênese *in vitro*.

Nossos resultados mostraram que após 8 dias de cultura, todos os tratamentos aos quais os fragmentos ovarianos foram submetidos permitiram a ativação dos folículos primordiais para folículos em desenvolvimento, porém, os fragmentos cultivados com EEB de *S. convoluta* apresentaram maior percentual de ativação folicular e menor percentual de degeneração celular, principalmente na concentração de 0,8 mg/mL. Fato que pode ser atribuído ao aporte energético-nutricional estabelecido no meio (JOZWIK, 1999).

Fisiologicamente, oócitos possuem certo grau de proteção contra o estresse oxidativo, pois o fluido folicular possui antioxidantes. Contudo, fora do ambiente fisiológico, os oócitos perdem a sua defesa natural e fatores como o consumo de oxigênio e nutrientes, e a interferência da luz, podem aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (Wang et al, 2002; Livingston et al, 2009). Assim, medidas de suporte como a adição de antioxidantes ao meio de cultivo, devem ser tomadas (Wang et al, 2002).

O menor percentual de folículos degenerados observado no grupo suplementado com EEB de *S. convoluta*, poder ser atribuído à atividade citoprotetora do extrato em virtude do seu

potencial antioxidante demonstrado por seus constituintes, flavonoides, considerado antioxidante mais eficientes que a vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) e  $\beta$ -caroteno (GAO et al, 2001) e que possui adicionalmente a propriedade de sequestrar as ROS, efeito demonstrado pela redução significativas nos níveis de ROS intracelular nos grupos SC1 e SC8. (LOPEZ-REVUELTA et al, 2006).

A falta de alteração no tamanho do oócito e do folículo entre os tratamentos é justificável pela ausência de fatores de crescimento e hormônios enriquecendo o meio de cultivo utilizado, pois, para a regulação da proliferação e diferenciação celular é necessário a interação entre os fatores locais e endócrinos (Silva, 2006). A ação de substâncias como as gonadotrofinas e somatotrofinas é necessária durante este processo de crescimento, pois atuam permitindo o retorno do desenvolvimento (Levi-setti, 1004; Williams, 1990).

O meio para cultivo celular difundido no mercado e utilizado rotineiramente possui substâncias como glicose, vitaminas e aminoácidos, responsáveis pela sobrevivência folicular (Hartshorne, 1997). Porém, os custos para compor tal meio encarecem os estudos, fazendo a nossa descoberta talvez uma importante alternativa para baratear as

pesquisas envolvendo preservação folicular.

Com base nos resultados, conclui-se que a adição do extrato etanólico bruto de *Selaginella convoluta* no cultivo *in vitro* de folículos inclusos em tecido ovariano ovino mantém a sobrevivência folicular, promove o desenvolvimento e diminui a formação de ROS no cultivo de folículos *in situ*. A concentração de 0,8 mg/mL deve ser

destacada devido aos resultados satisfatórios em todos os parâmetros avaliados após 8 dias de cultura. Sendo assim, este extrato pode ser uma alternativa barata e eficiente para a suplementação de meio de cultura, porém, ainda faz-se necessário maior conhecimento da composição química da planta e com ensaios farmacológicos mais específicos.

## Referências

- Agra, MF, Baracho, GS, Nurit, K, Basilio, IJLD, Coelho, VP. (2007). Medicinal And Poisonous Diversity Of The Flora Of “Caririparaibano”, Brazil. *JEthnopharmacol.* 383-395.
- Agra, MF, Silva, KN, Basílio, IJLD, Freitas, PF, Barbosa-Filho, JM. (2008). Survey Of Medicinal Plants Used In The Region Of Northeast Of Brazil. *Braz J Pharmacogn.* 472-508.
- Almeida, JRGS, Moraes, ACA, Ribeiro, RL, Goes, RMO, Quintans, JÚNIOR LJ. (2005). ‘Plantas Medicinais Comercializadas Por Raizeiros No Vale Do São Francisco.’ 1ª reunião Regional Da Sociedade Brasileira De Plantas Medicinais. (Livro De Resumos. Fortaleza-Ce).
- Bertoldo, M. J.; Duffard, N.; Bernard, J.; Frapsauce, C.; Calais, L.; Rico, C.; Mermillod, P.; Locatelli, Y. (2014). Effects of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) supplementation during culture of the sheep ovarian cortex. *Animal Reproduction Science*, v.149, n.3-4, 124-134,
- Celestino, JJH, Bruno, JB, Lima-Verde, IB, et al. (2010). Steady-State Level Of Kit Ligand Mrna In Goat Ovaries And The Role Of Kit Ligand In Preantral Follicle Survival And Growth In Vitro. *Molecular Reproduction & Development*, 77, P. 231-240.
- Chen Zhang et al. (2016). Effects Of Dimethyl Sulfoxide On The Morphology And Viability Of Primary Cultured Neurons And Astrocytes. (*Brain Research Bulletin*).
- Dalziel JM (1937). *The Useful Plants in West Tropical Africa*, vol. 1. (Crown Agents,

London) 612 .

Ferreira, T, Rasband, W. (2012) Image. J. User Guide IJ 1. 46r. (Reviewed by Michael Schmid).

Gao, Z, Huang, K. e Xu, H. (2001). Protective effects os flavonoids in the roots of *Scutellaria baicalensis* Georgii against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HS-SY5Y cells. *Pharmacol. Res.* 2, 173–8.

Gouveia, BB, Barros, VRP, Gonçalves, RJS, Barberino, RS, Menezes, VG, Lins, TLB, Macedo, TJS, Santos, JMS, Rolim, LA, Rolim Neto, PJ, Almeida, JRGS., Matos, MHT. (2015). Effect Of Ovarian Tissue Transportation In *Amburana Cearensis* Extract On The Morphology And Apoptosis Of Goat Preantral Follicles. *Anim. Reprod, Belo Horizonte*, V.12, N.2, 316-323.

Hirai, RY, Prado, J. (2000). ‘Selaginellaceae Willk.’ (*Braz J Bot. São Paulo, Brasil.*).

Jozwik , M, Wolczynski, S, Szamatowicz, M. (1999). Oxidative Stress Markers In Preovulatory Follicular Fluid In Humans. *Mol Hum Reprod*, V.5, 409-413.

Lee, J, Choi, Y, Woo, Er, Lee, Dg. (2009). Isocryptomerin, A Novel Membrane-Active Antifungal Compound From *Selaginella tamariscina*. *Biochembiophys Res Commun*, 676-80.

Macêdo, LARO, Oliveira Júnior, RG, Souza, GR, Oliveira, AP, Lavor, EM, Silva, MG, Pacheco, AGM, Menezes, IRA, Coutinho, HDM, Pessoa, CÓ, Costa, MP e Almeida, JRGS. (2018). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities and evaluation of cytotoxicity of the fractions obtained from *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (Selaginellaceae). Article in *Biotechnology & Biotechnological Equipment* (on line).

Lopez-Revuelta, A, Sanches-Gallego, J.I, Hernandez-Hernandez, A, Sanchez-Yague, J. e Llanillo, M. (2006). Membrane cholesterol contents influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damaged by oxidative stress. *Chemo-Biol. Interact.* 61, 79–91.

Markström, E, Svensson, EC, Shao, R. et al. (2002). Survival Factors Regulating Ovarian Apoptosis – Dependence On Follicle Differentiation. *Reproduction*, V. 123, 23-30,.

Barberino, RS, Barros, VRP, Menezes, VG, Santos, LP, Araújo, VR, Queiroz, MAA, Matos, MHT, Almeida, JRGS. and Palheta, JrRC. (2015a). *Amburanacearensis* leaf extract maintains survival and promotes in vitro development of ovine secondary follicles. *Cambridge University Press, Zygote*: 1-9



- Matos, MHT, Gouveia, BB, Barros, VRP, Gonçalves, RJS, Barberino, RS, Menezes, VG, Lins, TLB, Macedo, TJS, Santos, JMS, Rolim, LA, RolimNeto, PJ, Almeida, JRGS. (2015b). Effect of ovarian tissue transportation in *Amburanacearensis* extract on the morphology and apoptosis of goat preantral follicles. *Anim. Reprod*, Belo Horizonte, v.12, n.2, 316-323.
- Pietta, PG. (2000). 'Flavonoids As Antioxidants.' ( *J Nat Prod.*;63)
- Rodrigues, GQ, Silva, CMG, Faustino, LR, Bruno, JB, Pinto, LC, Lopes, CAP, Campello CC, Figueiredo Jr. (2010). Efeito de diferentes concentrações de hormônio folículo-estimulante recombinante sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos e ovinos isolados. *Acta veterinária brasilica*, V.4, N.3, 144-152.
- Roy, SK. (1993). Epidermal growth factor and transforming growth factor-beta modulation of follicle-stimulating hormone-induced deoxyribonucleic acid synthesis in hamster preantral and early antral follicles. *Biol Reprod*, v.48, 552–557.
- Ruijters, EJB, Weseler, AR, Kicken, C, Haenen, GRMM, e Bast, A. (2013). The flavanol (–)-epicatechin and its metabolites protect against oxidative stress in primary endothelial cells via a direct antioxidant effect. *Eur. J. Pharmacol.* 715, 147–53.
- Sá, PGS, Guimarães, AL, Oliveira, AP, Já, SF, Fontana AP, Damasceno, PKF, Branco, CRC, Branco, A, Almeida, JRGS. (2012). Fenóis Totais, Flavonoides Totais e Atividade Antioxidante de *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (Selaginellaceae). *Revista De Ciências Farmacêuticas Básica E Aplicada*, V. 33, N.4, 561-566.
- Silva, JRV, Van Den Hurk, R,; Matos, MHT, Santos, RR, Pessoa, C, Moraed, MO, Figueiredo JR. (2004). Influences of FSH and EGF on primordial follicles during *in vitro* culture of caprine ovarian cortical tissue. *Theriogenology*, v. 61, 1691- 1704.
- Telefo, PB, Tagne1, SR, Koonal, OES, Yemele, DM, Tchouanguép, FM. (2012). Effect of the aqueous extract of *Justicia insularis* t. Anders (acanthaceae) on ovarian folliculogenesis and fertility of female rats. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 9(2)197-203
- Tsai-Turton, M. e Luderer, U. (2006) Opposing effects of glutathione depletion and follicle-stimulating hormone on reactive oxygen species and apoptosis in cultured preovulatory rat follicles. *Endocrinology* 1224–1236.
- Van Der Mark Va et al. (2017). Stable Overexpression Of The Constitutive Androstane Receptor Reduces The Requirement For Culture With Dimethyl Sulfoxide For High Drug Metabolism In Heparg Cells S. *Drug MetabDispos*,56–67.
- Vieira, RJ. (2012). Biotécnicas Aplicadas À Reprodução Bovina: Generalidades,

Fortaleza- Ce. Ciência Animal, 55-65, – Edição Especial.

Wandji, SA, Eppig, JJ, Fortune, JE. (1996). FSH and growth factors affect the growth and endocrine function in vitro of granulosa cells of bovine preantral follicles. Theriogenology, v.45, 817-832.

Williams, GL. (1990). Suckling as regulator of postpartum rebreeding in cattle: a review. J Anim Sci, v.68, 831-852.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, o uso do EEB de *S. convoluta* foi eficaz para a manutenção da qualidade folicular durante o cultivo *in situ* de tecido ovariano, conservou a morfologia celular e estimulou o desenvolvimento folicular em todas as condições de cultivo. Porém, na concentração de 0,8 mg/mL permitiu maior ativação, menor degeneração dos folículos e redução na produção de ROS.

Porém, apesar da planta *S. convoluta* fitoquimicamente demonstrar características que são viáveis para a sobrevivência folicular e esta pesquisa apresentar resultados promissores no uso da referida espécie vegetal como suplemento no meio de cultivo de folículos ovarianos, outras pesquisas devem ser realizadas no intuito de avaliar e caracterizar especificamente as substâncias envolvidas na atividade citoprotetora observada nesta pesquisa.

## 8. ANEXOS

### 1. Comprovante de submissão de artigo pertencente ao capítulo 1.

**THERIOGENOLOGY** Contact us  Help ?

home | main menu | submit paper | guide for authors | register | change details | log out Username: revoredorgvet@gmail.com Switch To: Author Go to: [My EES Hub](#) Version: EES 2020.2

Submissions Being Processed for Author **Renata gomes revorêdo**

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
<a href="#">Action Links</a>		INTER-RELATIONSHIP BETWEEN BODY CONDITION SCORE AND OVARIAN RESERVE IN OVINE FEMALES	08 Feb 2020	08 Feb 2020	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

### 2. Comprovante de submissão de artigo pertencente ao capítulo 2.

Reproduction, Fertility and Development



#### Selaginella convoluta extract allows the growth and survival of pre-antral ovine follicles by inhibiting oxidative stress during in situ culture

Journal:	<i>Reproduction, Fertility and Development</i>
Manuscript ID:	RD19155
Manuscript Type:	Research paper
Date Submitted by the Author:	26-Apr-2019
Complete List of Authors:	Revorêdo, Renata; UFRPE, DMV; Babista, André; UFRPE, Veterinary Medicine; Silva, Diogo Manoel; UFRPE, Veterinary Medicine; Oliveira, Marcos Antonio Lemos; Universidade Federal Rural de Pernambuco, Medicina Veterinária; Almeida, Jackson Roberto; UNIVASF; Rodrigues, Cristiane Maria; UNIVASF; TEIXEIRA, ALVARO; UFRPE; Wischral, Aurea; UFRPE, Veterinary Medicine
Keyword:	antral follicle, apoptosis, cell culture, cumulus cell, fertility, follicular fluid, folliculogenesis, germ cell

SCHOLARONE™  
Manuscripts