



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

FRANCISCO DAS CHAGAS COSTA

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

SOBRAL – CEARÁ

2020

FRANCISCO DAS CHAGAS COSTA

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

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Análises Integrativas de Sistemas Biológicos. Área Temática: Fisiologia Reprodutiva.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Liza Paz Souza Batista

SOBRAL – CEARÁ

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C872e Costa, Francisco das Chagas.

Efeito da Aloe vera no cultivo in vitro e na criopreservação de folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano de bovinos / Francisco das Chagas Costa. – 2020.
119 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2020.

Orientação: Profa. Dra. Ana Liza Paz Souza Batista.

1. Folículos. 2. Cultivo in vitro. 3. Vitrificação. 4. Estresse oxidativo. 5. Aloe vera. I. Título.

CDD 660.6

FRANCISCO DAS CHAGAS COSTA

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

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Ceará – *Campus Sobral*, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Análises Integrativas de Sistemas Biológicos. Área Temática: Fisiologia Reprodutiva.

Aprovada em: 20/02/2020

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Ana Liza Paz Souza Batista (Orientadora)
(Universidade Federal do Ceará – UFC)

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

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

Prof. Dra. Gisvani Lopes de Vasconcelos
Centro Universitário - INTA (UNINTA)

*Á Deus, por todas as graças concedidas.
Aos meus pais, Francisca e Joaquim, pelo dom da vida.
Aos meus irmãos, pelo carinho e fraternidade.
Aos demais familiares e amigos.*

Com amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela fortaleza, resiliência, paciência, coragem e sabedoria para enfrentar os obstáculos. Sou grato pelo cuidado e proteção diários durante a minha caminhada em direção ao que acredito.

À minha orientadora, Prof. Ana Liza Paz Souza Batista, pelos ensinamentos diários, pelo incentivo, dedicação e disponibilidade inigualáveis e, principalmente, pelas lições de encorajamento, responsabilidade, disciplina, honestidade e generosidade.

Ao Prof. Dr. José Roberto Viana Silva, pela confiança depositada, pelos ensinamentos e encorajamento e pelas lições de disciplina, responsabilidade e honestidade.

Ao Prof. Dr. Anderson Weiny Barbalho Silva pelo apoio e valiosa contribuição e, sobretudo, pelas lições de encorajamento, boa vontade e otimismo em tudo que se propõe.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pelos ensinamentos ao longo do curso.

Aos meus pais, Francisca e Joaquim, que mesmo em sua profunda simplicidade e sem compreender bem minhas escolhas depositam em mim diariamente suas confianças.

À todos os meus muitos irmãos pela fraternidade, respeito e confiança.

Ao meu amigo Daniel, parceiro de morada, pela paciência diária e pelas veladas contribuições para tornar mais leve a realização do meu propósito.

À toda a equipe que compõe o Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia da Reprodução, Erlândia, Venância, Igo, Bianca, Laís, Pedro, Laryssa, Mônica, Efigênia, Jardeline e Danisvânia. Obrigado pela disponibilidade e ajuda, pelo incentivo, apoio e carinho.

Aos meus colegas de mestrado, Erlândia, Valéria, Sandro, Efigênia, Lucas, Renan e Haydee, pelos conhecimentos compartilhados e amizades firmadas.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo apoio financeiro para a concretização de minhas atividades de pesquisa durante o curso.

À universidade Federal do Ceará (UFC) e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade oferecida.

Ao Núcleo de Biotecnologia de Sobral (NUBIS) pela disponibilidade de equipamentos e por todo o apoio técnico despendido.

Agradeço também a todos os funcionários da UFC – *Campus* Sobral, pela disponibilidade, carinho e atenção.

À Prof. Dra. Gisvani Lopes de Vasconcelos por ter gentilmente aceito o convite para participar da banca de defesa desta Dissertação e pela solicitude em contribuir para o engrandecimento deste trabalho.

Agradeço, por fim, a todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização do meu propósito.

A todos, muito obrigado!

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da adição de *Aloe vera* no cultivo *in vitro* e na criopreservação de folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano de bovinos sobre a ativação e desenvolvimento, viabilidade, integridade morfológica, configuração da matriz extracelular (MEC) e expressão de mRNA para *SOD*, *CAT*, *PRDX6* e *GPXI*. A execução do estudo ocorreu em duas etapas. Na etapa I realizou-se o cultivo *in situ*, onde o córtex ovariano foi dividido em fragmentos de aproximadamente 3x3x1 mm que foram, em seguida, cultivados por 6 dias em placas de 24 poços contendo 1 ml de meio α -MEM⁺ sozinho ou suplementado com diferentes concentrações de *Aloe vera* (1%, 5%, 10% e 50%). Ao final do período de cultivo, os fragmentos foram submetidos à análise histológica para avaliação morfológica e desenvolvimento folicular, além da análise da MEC. Na etapa II, fragmentos ovarianos foram criopreservados pelo método de vitrificação em superfície sólida com apenas o meio para vitrificação sozinho ou suplementado com as duas melhores concentrações de *Aloe vera* da etapa I e descongelados após duas semanas. Após a descongelação, os fragmentos vitrificados foram submetidos às mesmas avaliações realizadas para os fragmentos cultivados *in vitro* na etapa I, além da análise de viabilidade utilizando-se calceína e etídio homodímero, expressão gênica para *SOD*, *CAT*, *PRDX6* e *GPXI* e capacidade de ativação e desenvolvimento folicular após a criopreservação utilizando-se, para isso, um cultivo *in vitro* durante 6 dias. Em relação à etapa I, os resultados mostraram que o tratamento com 50% de *Aloe vera* apresentou melhores taxas de folículos morfolologicamente normais do que o tratamento com 10% de *Aloe vera*. Contudo, melhores taxas de ativação e desenvolvimento folicular foram observadas na concentração de 10% na comparação com as demais concentrações utilizadas. Somado a isso, as concentrações de 10% e 50% de *Aloe vera* mantiveram níveis de colágeno no tecido semelhantes ao controle fresco. Com relação à etapa II foi observado que a presença de 10% de *Aloe vera* na solução de vitrificação manteve melhores taxas de folículos saudáveis. Além disso, ambas as concentrações testadas mantiveram níveis de colágeno similares ao controle fresco, níveis aumentados de mRNA para *SOD*, *PRDX6* e *GPXI* e taxas de ativação folicular significativamente mais altas do que a observada no grupo sem *Aloe vera*. Em conclusão, a presença da *Aloe vera* no meio de cultivo *in vitro* e na solução de vitrificação melhora a qualidade geral do folículo e do tecido ovariano, mantendo a viabilidade e promovendo ativação e desenvolvimento folicular, além de maior expressão de importantes genes associados ao estresse oxidativo.

Palavras-chave: *Aloe vera*. Cultivo *in vitro*. Estresse oxidativo. Folículos. Vitrificação.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the effects of the addition of *Aloe vera* on *in vitro* culture and on the cryopreservation of pre-antral follicles included in bovine ovarian tissue on the activation and development, viability, morphological integrity, configuration of the extracellular matrix (EC) and mRNA expression for *SOD*, *CAT*, *PRDX6* and *GPX1*. The study was carried out in two stages. In step I, *in situ* cultivation was performed, where the ovarian cortex was divided into fragments of approximately 3x3x1 mm, which were then cultured for 6 days in 24-well plates containing 1 ml of α -MEM⁺ medium alone or supplemented with different concentrations of *Aloe vera* (1%, 5%, 10% and 50%). At the end of the cultivation period, the fragments were submitted to histological analysis for morphological evaluation and follicular development, in addition to the EC analysis. In step II, ovarian fragments were cryopreserved by the method of vitrification on a solid surface with only the medium for vitrification alone or with this medium supplemented with the two best concentrations of *Aloe vera* from step I and thawed after two weeks. After thawing, the vitrified fragments were subjected to the same evaluations performed for fragments cultured *in vitro* in step I, in addition to the viability analysis using calcein and ethidium homodimer, gene expression for *SOD*, *CAT*, *PRDX6* and *GPX1* and capacity for follicular activation and development after cryopreservation using an *in vitro* culture for 6 days. Regarding step I, the results showed that treatment with 50% *Aloe vera* showed better rates of morphologically normal follicles than treatment with 10% *Aloe vera*. However, better rates of activation and follicular development were observed at a concentration of 10% in comparison with the other concentrations used. In addition, the 10% and 50% concentrations of *Aloe vera* maintained collagen levels in the tissue similar to the fresh control. Regarding step II, it was observed that the presence of 10% of *Aloe vera* in the vitrification solution maintained better rates of healthy follicles. In addition, both concentrations tested maintained collagen levels similar to fresh control, increased levels of mRNA for *SOD*, *PRDX6* and *GPX1* and significantly higher follicular activation rates than that seen in the group without *Aloe vera*. In conclusion, the presence of *Aloe vera* in the *in vitro* culture medium and in the vitrification solution improves the overall quality of the follicle and ovarian tissue, maintaining viability and promoting follicular activation and development, in addition to greater expression of important associated genes oxidative stress.

Keywords: *Aloe vera*. Follicles. *In vitro* cultivation. Oxidative stress. Vitrification.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1.** Esquema ilustrativo do ovário mamífero e suas principais estruturas.
Fonte: Junqueira; Carneiro (2013).....22
- Figura 2.** Visão geral da foliculogênese. Representação esquemática que ilustra as diferentes classes do desenvolvimento folicular, incluindo folículos pré-antrais: primordiais, primários e secundários, e folículos antrais: terciários e pré-ovulatórios. Fonte: Adaptado de Sánchez; Smitz (2012); Lima-Verde; Rosseto; Figueiredo (2011).....24
- Figura 3.** Moduladores da via de sinalização PI3K/Akt. RTK, receptor tirosina quinase; PI3K, fosfatidilinositol-3-quinase; PIP2, fosfatidilinositol-4-5-bifosfato; PIP3, fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato; PDK1, quinase 1 dependente de fosfatidilinositol; Akt, proteína quinase B; P, grupo fosfato; FOXO3, caixa de cabeçote O3; PTEN, fosfatase e homólogo da tensina. Fonte: Adaptado de Lee; Chang (2019).....26
- Figura 4.** Imagens da *Aloe vera* mostrando aspectos externos da planta (A, B) e corte transversal da folha mostrando o gel líquido e cristalino (C).....35

CAPÍTULO 2

- Figure 1.** Representative images of sections of bovine ovarian tissue showing morphologically normal (a-c) and atretic (d-f) follicles from different categories stained with hematoxylin and eosin. Normal primordial follicles (a) and atretic (d); normal (b) and atretic (e) primary; normal (c) and secondary atretic (f). Granulosa cells (GC); oocyte (O); oocyte nucleus (N). Scale bar: 100 μm75

Figure 2.

Percentages (mean \pm SE) of morphologically healthy follicles in the fresh control (uncultured tissue) and in the different treatment groups at the end of 6 days of culture with different concentrations of *Aloe vera*: MEM (cultured tissue without *Aloe vera*); AV1%, AV5%, AV 10% and AV50% (cultured tissue in the presence of 1%, 5%, 10% or 50%, respectively, of *Aloe vera*). a, b, c Different lowercase letters indicate statistically significant differences between treatments.....75

Figure 3.

Percentages (mean \pm SE) of primordial follicles in the fresh control (uncultured tissue) and in the different treatment groups at the end of 6 days of culture with different concentrations of *Aloe vera*: MEM (cultured tissue without *Aloe vera*); AV1%, AV5%, AV 10% and AV50% (cultured tissue in the presence of 1%, 5%, 10% or 50%, respectively, of *Aloe vera*). a, b, c Different lowercase letters indicate statistically significant differences between treatments.....76

Figure 4.

Percentages (mean \pm SE) of developing follicles in the fresh control (uncultured tissue) and in the different treatment groups at the end of 6 days of culture with different concentrations of *Aloe vera*: MEM (cultured tissue without *Aloe vera*); AV1%, AV5%, AV 10% and AV50% (cultured tissue in the presence of 1%, 5%, 10% or 50%, respectively, of *Aloe vera*). a, b, c Different lowercase letters indicate statistically significant differences between treatments.....76

Figure 5.

Collagen levels (mean \pm SE) in the ovarian tissue analyzed by the picosirius red and observed under optical microscopy (400x) in the fresh control (uncultured tissue) and in the different treatment groups at the end of 6 days of culture with different concentrations of *Aloe vera*: MEM (cultured tissue without *Aloe vera*); AV1%, AV5%, AV 10% and AV50% (cultured tissue in the presence of 1%, 5%, 10% or 50%, respectively, of *Aloe vera*). a, b, c Different lowercase letters indicate statistically significant differences between treatments.....77

Figure 6. Representative images of collagen fibers labeled by a red picrosirius stain and observed under optical microscopy (400x). Fresh control; MEM (b); 1% AV (c); 5% AV (d); 10% AV (e); 50% AV (f). The black arrow shows an uncolored follicular area. Scale bar: 100 μ m.....78

CAPÍTULO 3

Figure 1. Percentages (mean \pm SE) of morphologically healthy follicles in the fresh control (tissue not subjected to cryoprotectant) and in different treatment groups after contact with the cryoprotectant: vitrification solution without *Aloe vera* (VS[AV0%]); vitrification solution with 10% *Aloe vera* (VS[AV10%]) and vitrification solution with 50% *Aloe vera* (VS[AV50%]). (P<0.05).....94

Figure 2. Collagen levels (mean \pm SE) in the ovarian tissue analyzed by the picrosirius red in the fresh control (tissue not subjected to cryoprotectant) and in different treatment groups after contact with the cryoprotectant: vitrification solution without *Aloe vera* (VS[AV0%]); vitrification solution with 10% *Aloe vera* (VS[AV10%]) and vitrification solution with 50% *Aloe vera* (VS[AV50%]).). a,b,c Different letters indicate significant difference between treatments (P<0.05).....95

Figure 3. Percentages (mean \pm SE) of morphologically healthy follicles in different follicular categories in the fresh control (non-vitrified tissue) and in different treatment groups after vitrification: vitrification solution without *Aloe vera* (VS[AV0%]); vitrification solution with 10% *Aloe vera* (VS[AV10%]) and vitrification solution with 50% *Aloe vera* (VS[AV50%]). (P<0.05).....96

Figure 4. Viable bovine secondary follicles in different follicular categories in different treatment groups after vitrification: vitrification solution without *Aloe vera* (VS[AV0%]); vitrification solution with 10% *Aloe vera* (VS[AV10%]) and vitrification solution with 50% *Aloe vera* (VS[AV50%]).....96

Figure 5.

(A) Representative images of collagen fibers labeled by red spots of picosirius and observed under optical microscopy (400x). Fresh control (a); VS[AV0%] (b); VS[AV10%] (c) and VS[AV50%] (d). The black arrows show the colorless follicular area. Scale bar: 100 μm . (B) Collagen levels (mean \pm SE) in the ovarian tissue analyzed by the picosirius red in the fresh control (non-vitrified tissue) and in different treatment groups after vitrification: vitrification solution without *Aloe vera* (VS[AV0]); vitrification solution with 10% *Aloe vera* (VS[AV10]) and vitrification solution with 50% *Aloe vera* (VS[AV50]). a,b,c Different letters indicate significant difference between treatments ($p < 0.05$).....97

Figure 6.

Levels of mRNA (means \pm SE) for *SOD* (A), *CAT* (B), *PRDX6* (C) and *GPX1* (D) in the fresh control (non-vitrified tissue) and in different treatment groups after vitrification: vitrification solution without *Aloe vera* (VS[AV0%]); vitrification solution with 10% *Aloe vera* (VS[AV10%]) and vitrification solution with 50% *Aloe vera* (VS[AV50%]).]. a,b,c Different letters indicate significant difference between treatments ($P < 0.05$).....98

Figure 7.

Representative images of sections of vitrified and cultured bovine ovarian tissue showing morphologically normal (a-c) and atretic (d-f) follicles from different categories stained with hematoxylin and eosin. Normal primordial follicles (a) and atretic (d); normal (b) and atretic (e) primaries; normal (c) and atretic (f) secondary. Granulosa cells (GC); oocyte (O); oocyte nucleus (N). Scale bar: 100 μm99

Figure 8.

Percentages (mean \pm SE) of morphologically healthy follicles in the fresh control (non-vitrified and uncultured tissue) and in different treatment groups after vitrification and *in vitro* culture of ovarian tissue: vitrification solution without *Aloe vera* (VS[AV0%]); vitrification solution with 10% *Aloe vera* (VS[AV10%]) and vitrification solution with 50% *Aloe vera* (VS[AV50%]).]. a,b,c Different letters indicate significant difference be-

tween treatments (P<0.05).....100

Figure 9. Percentage (mean ± SE) of morphologically healthy primordial follicles in the fresh control (non-vitrified and uncultured tissue) and in different treatment groups after vitrification and *in vitro* culture of ovarian tissue: vitrification solution without *Aloe vera* (VS[AV0%]); vitrification solution with 10% *Aloe vera* (VS[AV10%]) and vitrification solution with 50% *Aloe vera* (VS[AV50%]). a,b,c Different letters indicate significant difference between treatments (P<0.05).....100

Figure 10. Percentage (means ± SE) of morphologically healthy developing follicles in the fresh control (non-vitrified and uncultured tissue) and in different treatment groups after vitrification and *in vitro* culture of ovarian tissue: vitrification solution without *Aloe vera* (VS[AV0%]); vitrification solution with 10% *Aloe vera* (VS[AV10%]) and vitrification solution with 50% *Aloe vera* (VS[AV50%]). a,b,c Different letters indicate significant difference between treatments (P<0.05).....101

Figure 11. Collagen levels (mean ± SE) in the ovarian tissue analyzed by the picrosirius red in the fresh control (non-vitrified and uncultured tissue) and in different treatment groups after vitrification and culture: vitrification solution without *Aloe vera* (VS[AV0%]); vitrification solution with 10% *Aloe vera* (VS[AV10%]) and vitrification solution with 50% *Aloe vera* (VS[AV50%]). (P<0.05). a,b,c Different letters indicate significant difference between treatments (p<0.05).....101

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1.	Demonstrativo do meio de cultivo utilizado de acordo com o método de cultivo e a espécie.....	29
Tabela 2.	Substâncias rotineiramente utilizadas na suplementação do meio de base para cultivo <i>in situ</i> de tecido ovariano.....	30
Tabela 3.	Principais componentes da <i>Aloe vera</i> . Fonte: Choi; Chung (2003); Surjushe et al., (2008); Pandey; Singh (2016).....	36

CAPÍTULO 1

Tabela 1.	Principais espécies reativas de oxigênio.....	47
------------------	---	----

CAPÍTULO 3

Tabela 1.	Primers pairs used for real-time PCR.....	93
------------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP	Agente crioprotetor
AGE	Produto final de glicação avançada
Akt	Proteína quinase B
AV	<i>Aloe vera</i>
BLIMP1	Proteína de maturação induzida por linfócitos B – 1
BMP2	Proteína morfogenética óssea do tipo 2
BMP4	Proteína morfogenética óssea do tipo 4
BSA	Albumina sérica bovina
CAT	Catalase
CGPs	Células germinativas primordiais
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DND1	Homólogo de proteínas sem saída 1
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FIG α	Fator na linha germinativa alfa
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FOPAS	Folículos ovarianos pré-antrais
FSH	Hormônio folículo estimulante
GPX	Glutathione peroxidase
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ITS	Insulina, transferrina, selênio
LH	Hormônio luteinizante
MII	Metáfase II
McCoy	Meio base de McCoy
MDA	Malondialdeído
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MOIFOPA	Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais
mtDNA	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial

mRNA	RNA mensageiro
NANOG	Proteína Homeobox
NANOS3	Nanos homólogo 3
OCT4	Fator de transcrição 4 de ligação ao octâmero
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PRDM14	Proteína dedo de zinco de domínio PR 14
PTEN	Homólogo de fosfatase e tensina
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
SOD	Superóxido dismutase
TCM199	Meio de cultura de tecidos 199
α -MEM	Meio essencial mínimo alfa
α -MEM ⁺	Meio essencial mínimo alfa suplementado

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
~	Aproximadamente
± SEM	Erro padrão da média
≥	Maior ou igual a
≤	Menor ou igual a
°C	Graus Celsius
CO ₂	Dióxido de carbono
h	Hora
min	Minuto
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
M	Molar
kD	Quilodalton
Fe	Ferro
Se	Selênio
P<0,05	Probabilidade de erro menor que 5%
P>0,05	Probabilidade de erro maior que 5%

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	19
2.	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	O ovário mamífero	22
2.2	Características do crescimento folicular o oocitário <i>in vivo</i>	23
2.3	Cultivo <i>in vitro</i> de folículos ovarianos	27
2.3.1	<i>Meios de cultivo de folículos ovariano</i>	29
2.4	Criopreservação de tecidos e células	30
2.5	Adição de antioxidantes aos meios de cultivo <i>in vitro</i> e solução de vitrificação.....	34
2.5.1	<i>Aloe vera</i>	35
3.	JUSTIFICATIVA	38
4.	HIPÓTESES	40
5.	OBJETIVOS	41
5.1	Objetivo geral	41
5.2	Objetivos específicos	41
6.	CAPÍTULO 1: Influência das espécies reativas de oxigênio no cultivo <i>in vitro</i> de gametas femininos de mamíferos domésticos	42
7.	CAPÍTULO 2: Effect of <i>Aloe vera</i> extract on <i>in vitro</i> culture of preantral follicles included in bovine ovarian tissue	68
8.	CAPÍTULO 3: Effect of <i>Aloe vera</i> on cryopreservation of preantral follicles included in bovine ovarian tissue	84
9.	CONCLUSÕES GERAIS	109
10.	PERSPECTIVAS	110
	REFERÊNCIAS	111

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior exportador de carne bovina do mundo e esta produção é uma das principais atividades da economia brasileira. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2019), o país segue com o maior rebanho comercial do mundo, com cerca de 213,5 milhões de animais. Esse desenvolvimento do rebanho bovino impacta significativamente o cenário socioeconômico mundial, atuando como fonte de renda para criadores, além de produzir alimento de alto valor nutricional e contribuir com valioso material genético voltado às pesquisas para reprodução animal (EMBRAPA, 2008). Nesse sentido, estudos que promovam o desenvolvimento e aprimoramento de biotécnicas que possibilitem rápida multiplicação de bovinos geneticamente superiores podem contribuir para o desenvolvimento da economia nacional e aumentar, ainda mais, a participação do Brasil no mercado pecuarista internacional, além de permitir a aplicabilidade desses conhecimentos na medicina humana.

Com esse objetivo, biotécnicas reprodutivas, tais como fertilização *in vitro* e transferência de embriões podem ser amplamente aplicadas às espécies domésticas. No entanto, para sua execução é necessária uma grande quantidade de oócitos competentes capazes de produzir embriões e, conseqüentemente, crias viáveis (ROSSETO et al., 2011). Para isso, a biotécnica de Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais (MOIFOPA) tem se destacado por possibilitar a recuperação de um número significativo de oócitos a partir de folículos pré-antrais em espécies domésticas (ARAÚJO, 2014). Com essa técnica, é possível então, resgatar a população de folículos ovarianos pré-antrais dos ovários antes que sejam perdidos pelo processo natural de atresia folicular e cultivá-los, de forma isolada ou *in situ*, juntamente com os oócitos imaturos neles contidos até o estágio de maturação (FIGUEIREDO et al., 2002). Nesse contexto, a MOIFOPA representa importante ferramenta para a otimização do potencial reprodutivo de fêmeas no cenário da reprodução animal (FIGUEIREDO; LIMA, 2017).

Aliada ao cultivo, a criopreservação tem ganhado destaque por apresentar-se como uma estratégia promissora para programas conservacionistas e de melhoramento genético, preservando gametas de espécies ou raças de animais em vias de extinção (ROCHA et al., 2018) bem como para a restauração da fertilidade em mulheres submetidas à rádio ou quimioterapia ou em mulheres com risco de falha ovariana (OKTAY et al., 2018). Um dos métodos de criopreservação, a vitrificação, por exemplo, permite a conservação de tecido ovariano de pacientes submetidas a tratamento quimioterápico com potencial efeito gonadotóxico, man-

tendo-os conservados por um período indeterminado ou até que se tenha restaurado a saúde para futura reprodução (KLOCKE, et al., 2015).

Apesar do progresso já obtido, sistemas de cultivo e protocolos de criopreservação ainda enfrentam desafios. Esse fato tem motivado a realização de pesquisas que busquem o aperfeiçoamento de meios de cultivo e de criopreservação, com a implementação de substâncias que sejam capazes de proporcionar o adequado desenvolvimento folicular e a manutenção de sua ultraestrutura e, portanto, a maturação oocitária eficiente após procedimentos de cultivo e criopreservação (FIGUEIREDO et al., 2017; LEN et al., 2019).

Neste sentido, um grande limitante no aperfeiçoamento dessas biotécnicas é a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS). Esse efeito, ao desencadear o estresse oxidativo, pode ocasionar danos mitocondriais e ao DNA, comprometendo suas estruturas e funções (KASHKA; ZAVAREH; LASHKARBOLOUKI, 2016). Adicionalmente, pode ocorrer peroxidação lipídica além de prejuízos a proteínas celulares com consequente redução da qualidade oocitária e dos embriões produzidos (LINS et al., 2017). Além disso, o excesso de EROS nas células da granulosa resulta em apoptose com consequente atresia folicular e disfunção ovariana (SAEED-ZIDANE et al., 2017). Assim, a identificação de novas substâncias que sejam capazes de evitar e/ou prevenir danos causados pelo estresse oxidativo durante cultivo *in vitro* ou criopreservação e que não sejam tóxicas à célula apresenta-se como uma excelente alternativa.

Dado isso, a utilização de extratos de plantas tem ganhado bastante espaço (SAADIA et al., 2015). Em suínos, por exemplo, a utilização de dois extratos vegetais (*Kefir* e *Spirulina maxima*) foi responsável pelo desenvolvimento de folículos pré-antrais sem apresentar citotoxicidade (PLAZAS, 2015). A rutina, outro produto de origem vegetal, pertencente ao grupo dos flavonoides, apresentou atividade antioxidante em cultivo de folículos secundários ovinos durante 12 dias (LINS, et al., 2017). Ainda, o resveratrol, um polifenol sintetizado por muitas plantas, proporcionou maior viabilidade do tecido ovariano bovino com efeito positivo contra a degeneração dos folículos pré-antrais envoltos em fragmentos ovarianos (ROCHA et al., 2018).

No contexto do potencial dos extratos vegetais como atenuadores do estresse oxidativo tem ganhado destaque a *Aloe vera* (AV). De fato, estudos já apontaram que a planta contém quantidades substanciais de antioxidantes, incluindo α -tocoferol (vitamina E), carotenoides, ácido ascórbico (vitamina C), flavonoides e taninos (RADHA; LAXMIPRIYA, 2015). Com efeito, estudo conduzido por Sumi et al. (2019) indicou a presença, no extrato de AV, de boas quantidades de antioxidantes fenólicos, como o hidrato de catequina, ácido cafeico, áci-

do felúrico, ácido elágico e quercetina. Estes autores sugerem que a presença de diversas substâncias com poder antioxidante pode eliminar sinergicamente os radicais livres com mais eficiência do que compostos antioxidantes únicos (SUMI et al., 2019). Somando-se a isso, a AV tem demonstrado, também, capacidade de modular positivamente o nível de importantes enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX) em tecido testicular de ratos (BEHMANESH et al., 2018; BALA et al., 2016). Já em relação aos efeitos da AV em protocolos de criopreservação, Souza et al. (2016) e Aguiar et al. (2012) verificaram efeito positivo do extrato de AV ao criopreservar espermatozoides de animais silvestres e domésticos, respectivamente. Diante do exposto, observa-se o expressivo potencial do extrato da AV como agente protetor de gametas femininos inclusos no tecido ovariano de bovinos submetidos a protocolos de cultivo *in vitro* e criopreservação.

Para um maior esclarecimento da importância deste estudo, a revisão de literatura irá abordar aspectos relacionados ao ovário mamífero; características do crescimento folicular e oocitário; técnicas de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos; criopreservação de tecidos e células e uso de produtos vegetais na composição do meio de cultivo de folículos ovarianos.

Durante o desenvolvimento, os ovários cumprem dois processos fundamentais: o primeiro caracteriza a função gametogênica que corresponde à formação, maturação e liberação de um oócito inteiramente competente para a fertilização e desenvolvimento embrionário, o segundo refere-se à síntese e secreção de hormônios essenciais para o desenvolvimento folicular, ciclicidade menstrual/estro e manutenção do trato reprodutivo e sua função, que retrata a função endócrina deste órgão (PORRAS-GÓMEZ; MORENO-MENDOZA, 2017; ARAÚJO et al., 2014). A função gametogênica do ovário é exercida pela interação de dois fenômenos, a oogênese e a foliculogênese; estes correspondem a processos biológicos complexos e coordenados que requerem uma série de eventos que induzem as mudanças morfológicas e funcionais dentro do folículo, conduzindo a diferenciação de células e o desenvolvimento dos oócitos (SÁNCHEZ; SMITZ, 2012). Assim, o conhecimento acerca das características do desenvolvimento folicular que ocorre nos ovários em condições *in vivo* torna-se imprescindível para as devidas aplicações *in vitro*.

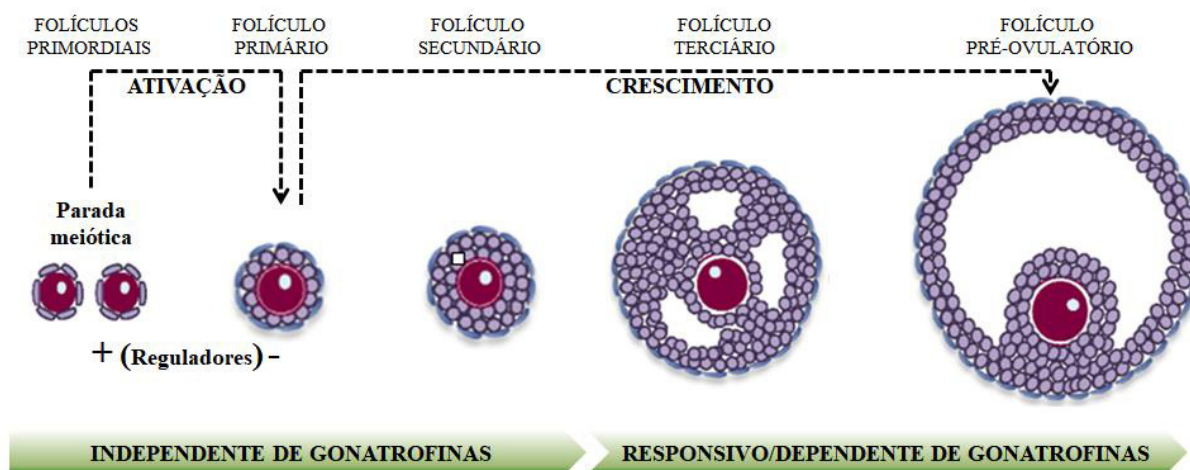
2.2. Características do crescimento folicular e oocitário *in vivo*

A foliculogênese refere-se ao processo de formação, crescimento e maturação folicular, envolvendo uma série de mudanças sequenciais em componentes da parede folicular como as células da teca e células da granulosa, além de modificações no oócito (ARAÚJO et al., 2014). Por esse motivo, em mamíferos, o desenvolvimento folicular é caracterizado como um processo contínuo (SATO, 2015), que se inicia com a formação dos folículos primordiais, que durante o seu desenvolvimento passam pelos estágios de folículos primários, secundários, terciários e, finalmente chegam ao estágio pré-ovulatório (Figura 2), fase que termina com a ovulação do oócito maturado (ADONA et al., 2012). Dessa forma, os folículos ovarianos são caracterizados como complexos em fases transitórias possuindo um oócito circundado por células somáticas (células da granulosa e tecais), responsáveis por determinar o ciclo reprodutivo (SPITSCHAK; HOEFLICH, 2018).

Folículos são as unidades morfofuncionais do ovário, sendo divididos em dois grupos de acordo com suas características morfológicas: (1) folículos pré-antrais ou não cavitários e (2) folículos antrais ou cavitários. A maioria da população folicular, cerca de 90 a 95%, encontra-se no estágio pré-antral, correspondendo ao maior estoque de oócitos em ovários mamíferos, formando o *pool* de reserva de folículos em estado quiescente e, após passarem por ativação, iniciam um processo sequencial de crescimento que é regulado por diversos hormônios e fatores de crescimento (SÁNCHEZ; SMITZ, 2012; FIGUEIREDO et al., 2008).

No entanto, a maioria desses folículos (99,9%) não chega à fase pré-ovulatória entrando em atresia por meio de morte celular programada, processo também conhecido como apoptose (MARTINS et al., 2008).

Figura 2. Visão geral da foliculogênese. A representação esquemática ilustra as diferentes classes do desenvolvimento folicular, incluindo folículos pré-antrais: primordiais, primários e secundários, e folículos antrais: terciários e pré-ovulatórios.



Fonte: Adaptado de Sánchez; Smitz (2012); Lima-Verde; Rosseto; Figueiredo (2011).

O processo de formação folicular tem início no período fetal na maioria das espécies de mamíferos, incluindo primatas e ruminantes (KNIGHT; GLISTER, 2001). Ao final do primeiro mês de desenvolvimento embrionário em mamíferos, as células germinativas primordiais (CGPs) migram do saco vitelino até os primórdios gonadais, onde começam a se desenvolver as gônadas. A migração, proliferação e colonização de CGPs para as gônadas em desenvolvimento são controladas por muitos fatores e dependem também da interação das CGPs e de suas células somáticas circundantes. Estudos *in vitro* demonstraram que BMP2 e BMP4 aumentam o número de CGPs de camundongos em cultura e que a ativina aumenta o número de CGPs em humanos (PESCE; KLINGER; FELICI, 2002). O papel de fatores de transcrição derivados de células germinativas nesse estágio também foi demonstrado. Isso inclui fatores como BLIMP1 e PRDM14, que são críticos para a proliferação e migração de CGPs (OHINATA et al., 2005; YAMAJI et al., 2008) bem como OCT4 e NANOG, essenciais para a sobrevivência das CGPs (KEHLER et al., 2004; YAMAGUCHI et al., 2009). Além disso, outros fatores parecem ser necessários para a sobrevivência dessas células como o FIGa, responsável pela expressão precoce das glicoproteínas que formarão a zona pelúcida (SOYAL, AMLEH, DEAN, 2000), NANOS3 e DND1, duas proteínas de ligação a

RNA que protegem as CGPs de sofrerem apoptose, bem como a via do Kit-ligand (TSUDA et al., 2003; YOUNGREN et al., 2005; JULATON; PERA, 2011).

Nas gônadas, as CGPs se dividem e transformam-se em oogônias. Essa divisão é bastante intensa, existindo no segundo mês de vida intrauterina, aproximadamente 600 mil oogônias e, por volta do quinto mês, mais de 7 milhões. No terceiro mês, as oogônias entram no estágio de prófase da primeira divisão meiótica, no entanto, param na fase de diplóteno e não progridem para as fases seguintes da meiose. As células na fase de diplóteno constituem os oócitos que são envolvidos por uma camada de células da granulosa achatadas denominados folículos primordiais (SATO, 2015; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Na puberdade, devido à liberação do pico pré-ovulatório do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH), ocorre uma progressão da divisão meiótica, com isso, são formados os oócitos secundários e ocorre outra parada na fase de metáfase II. Apenas após a fecundação do oócito pelo espermatozoide a meiose é retomada e, a partir disso, origina-se o oócito haploide fecundado, chegando ao final da oogênese (FIGUEIREDO et al., 2008).

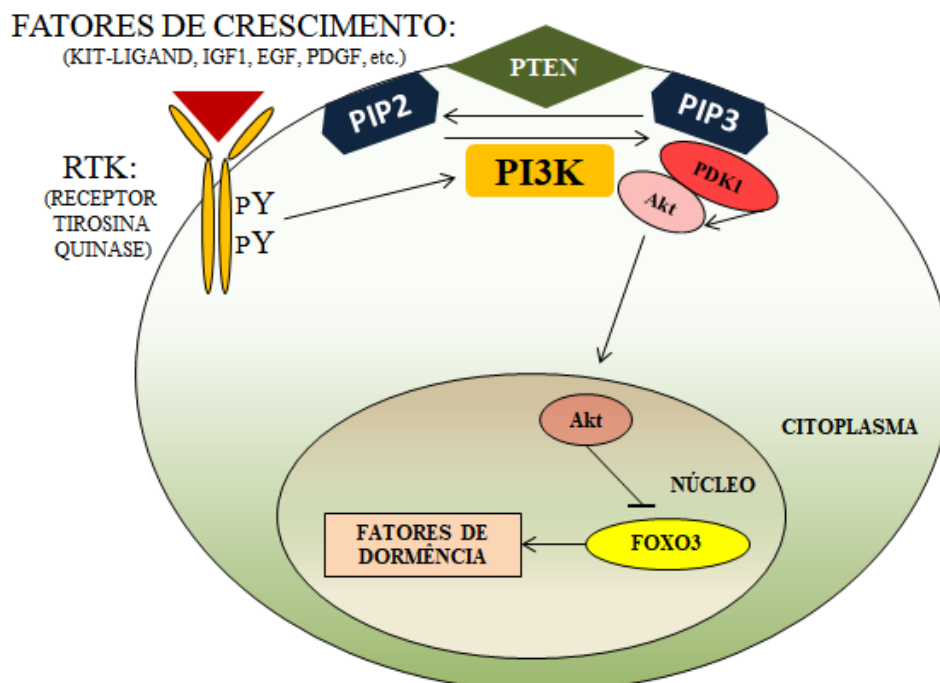
Na espécie bovina, a primeira prófase meiótica tem início entre os dias 75 e 80 de gestação. No estágio de diplóteno da meiose, no período de 150 e 180 dias de gestação, os folículos primordiais se formam, e os oócitos presentes nesses folículos permanecem quiescentes até serem ativados para a fase de crescimento (MELLO et al., 2013). A ativação folicular tem início quando ocorre a retomada da proliferação de células da granulosa. Nesse sentido, folículos primordiais, que apresentam uma camada de células no formato achatado passam a apresentar células em formato cuboide, sendo então caracterizados como folículos primários. Além de alterações no formato das células da granulosa, ocorre aumento no volume do citoplasma e núcleo do oócito. Nessa fase inicial, os folículos são independentes do hormônio folículo estimulante (FSH) para o seu crescimento, como evidenciado pelo fato de que o desenvolvimento para os demais estágios pode ocorrer na ausência desse hormônio, embora receptores para o FSH estejam presentes nas células da granulosa desses folículos precoces (O'SHAUGHNESSY et al, 1996; OKTAY et al., 1997).

A ativação folicular primordial é um processo muito dinâmico e rigidamente controlado e, apesar do enorme progresso realizado, muitos mecanismos moleculares ainda não são totalmente compreendidos (GOUGEON; BUSSO, 2000; HIRSHFIELD, 1991; MATINS et al., 2008). Sabe-se, no entanto, que a via de sinalização PTEN/PI3K (Figura 3) é uma via crucial necessária para a ativação dos folículos primordiais. A ativação da via PI3K leva à ativação de seu componente AKT, uma proteína quinase serina/treonina que aumenta a proli-

feração e sobrevivência celular, enquanto o PTEN é um regulador negativo da PI3K (MAI-DARTI et al., 2019).

Durante a foliculogênese, os folículos passam a interagir com as células da granulosa, essa interação tem início no estágio de folículo primário e é essencial para o desenvolvimento folicular e oocitário. A partir do estágio de folículo primário, as células da granulosa sofrem intensa multiplicação dando origem a mais uma camada de células de formato cuboide, formando os folículos secundários. Neste estágio o núcleo do oócito passa a se posicionar de forma excêntrica e as organelas celulares movem-se se posicionando perifericamente. No decorrer do desenvolvimento folicular a zona pelúcida se torna espessa e visível e com o crescimento dos folículos secundários e organização das células da granulosa, tem-se início a formação de uma cavidade contendo líquido, denominada antro. Uma vez formada a cavidade antral, os folículos são denominados terciários ou antrais (LUCCI et al., 2001; ROSSETTO et al., 2011).

Figura 3. Moduladores da via de sinalização PI3K/Akt. RTK, receptor tirosina quinase; PI3K, fosfatidilinositol-3-quinase; PIP2, fosfatidilinositol-4-5-bifosfato; PIP3, fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato; PDK1, quinase 1 dependente de fosfatidilinositol; Akt, proteína quinase B; P, grupo fosfato; FOXO3, caixa de cabeçote O3; PTEN, fosfatase e homólogo da tensina.



Fonte: Adaptado de Lee; Chang (2019).

Na espécie bovina o desenvolvimento dos folículos antrais segue um padrão conhecido como onda de crescimento folicular, que possui três diferentes fases (BARUSELLI et

al., 2007). Na primeira fase, conhecida como recrutamento, inicia-se o crescimento de vários folículos sob o controle das gonadotrofinas. A fase seguinte, de seleção e dominância é caracterizada pelo crescimento de um folículo em relação aos demais, tornando-se dominante. Durante essa fase o crescimento folicular está condicionado à presença de FSH e LH. Além disso, o folículo dominante é responsável pela produção de elevada quantidade de estrógeno. A terceira fase diz respeito à ovulação, que acontece em decorrência do pico elevado de LH liberado pela hipófise. Para que a fase ovulatória ocorra é necessário além do aumento nos níveis de estrógenos, a diminuição dos níveis de progesterona. Dessa forma, havendo a presença de um corpo lúteo funcional, que é responsável pela produção de progesterona, não haverá ovulação. Após o período de ovulação, os folículos que não ovularem serão mortos por atresia (OLIVEIRA; SARAPIÃO; QUINTÃO, 2014).

2.3. Cultivo *in vitro* de folículos ovarianos

A partir do conhecimento acerca dos processos de desenvolvimento folicular e oocitário que ocorre *in vivo*, é possível mimetizar este ambiente e trazer melhoras no desenvolvimento folicular e/ou oocitário *in vitro* resultando em um melhor aproveitamento das células foliculares. Nesse sentido, a Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais – MOIFOPA, também conhecida como ovário artificial tem sido bastante investigada, apresentando como principal objetivo resgatar os folículos pré-antrais a partir do tecido ovariano, e posteriormente cultivá-los *in vitro* até a maturação dos oócitos inclusos nestes folículos, prevenindo-os da atresia e possibilitando a utilização destes em outras biotécnicas reprodutivas, como a fertilização *in vitro* (FIV), a transgênese e a clonagem (ARAUJO, et al., 2014). Para tanto, sistemas de cultivo *in vitro* com folículos ovarianos pré-antrais (FOPA's) isolados ou inclusos em fragmentos do córtex ovariano, têm sido experimentados a fim de obter um protocolo ideal e bem estabelecido que permita um excelente crescimento e maturação folicular, seguido da produção de embriões e crias viáveis (FIGUEIREDO et al., 2008).

No sistema de cultivo de folículos isolados, os FOPA's devem ser desprendidos do tecido ovariano que os envolve (PAES et al., 2016). Para o isolamento folicular, é possível a utilização de métodos mecânicos, químicos, enzimáticos ou ainda por meio da utilização desses métodos em associação (ROSSETTO et al., 2011), todavia o isolamento mecânico sozinho tem sido o mais utilizado, apresentando resultados satisfatórios (DONG et al., 2014). O cultivo de FOPA's isolados apresenta como vantagem o monitoramento diário do crescimento de cada folículo individualmente, bem como a verificação do efeito *in vitro* de hormônios e

fatores de crescimento sobre cada classe folicular de maneira bem específica (RAMESH et al., 2010).

Já no cultivo *in situ*, os FOPA's permanecem inclusos no córtex do tecido ovariano, o que evita a exposição prolongada das células ao ambiente externo (ARAÚJO et al., 2014). Nessa técnica, dependendo da espécie, os ovários podem ser cultivados inteiros como é o caso de camundongos ou, caso o tamanho do ovário não permita tal metodologia, a região cortical do ovário poderá ser fragmentada em cortes de aproximadamente 3x3x1mm, e estes serão, então, cultivados *in vitro* (O'BRIEN; PENDOLA e EPPIG, 2003). Por este método mantem-se a integridade estrutural dos folículos, bem como as interações entre as células foliculares e as células adjacentes, como as do estroma, da teca e da granulosa, o que favorece de maneira significativa o crescimento folicular, visto que o ambiente nessas condições aproxima-se mais do ambiente no qual o folículo está inserido *in vivo*, evitando a exposição prolongada das células ao meio externo e facilitando uma melhor perfusão do meio de cultivo para o tecido ovariano (AGUIAR, 2016).

O cultivo *in situ* tem sido apontado como alternativa para investigar o efeito tóxico de substâncias quimioterápicas sobre o tecido ovariano utilizando modelos animais, mas com importante repercussão na medicina humana permitindo, dessa forma, avaliar o impacto das drogas terapêuticas na fertilidade feminina (GANDOLFI et al., 2006). Além disso, a incubação *in situ* de folículos pré-antrais, que envolve a cultura de tecido ovariano *in vitro*, permite monitorar a resposta folicular e ovariana a diferentes substâncias, como fatores de crescimento e hormônios (GUERREIRO et al., 2016). Adicionalmente, Telfer et al. (2008) sugerem que o modelo *in situ* pode ser utilizado em conjunto com o cultivo isolado quando propõem, por exemplo, um cultivo de dois passos no qual é realizado, inicialmente, o cultivo *in situ*, o que permite a ativação e o desenvolvimento do folículo primordial até o estágio secundário, para posteriormente ser isolado e cultivado até o estágio antral.

Por fim, convém considerar que uma etapa importante para a implementação de um sistema de cultivo é a escolha dos suplementos adequados a serem adicionados ao meio base (ROSSETO et al., 2013). Embora os meios de cultivo sejam compostos basicamente de vitaminas, aminoácidos e sais (FIGUEIREDO et al., 2008), a variedade e as concentrações de aditivos diferem, o que pode afetar cultivos foliculares *in vitro* e explicar a não conformidade dos resultados obtidos por diferentes grupos de pesquisa, embora o meio tenha sido suplementado com os mesmos hormônios e fatores de crescimento (ROSSETO et al., 2013). Por esse motivo, é importante levar em consideração que cada tipo de célula, bem como o sistema de cultivo adotado, requer um meio com composição bem determinada que possa suprir suas

necessidades metabólicas, energéticas e estruturais específicas já que as mesmas vias metabólicas e bioquímicas básicas no organismo precisam ser consideradas nas células cultivadas (MOLINARO, 2010).

2.3.1. Meios de cultivo de folículos ovarianos

Estudos têm demonstrado que a composição do meio de cultivo é um fator chave para promover o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais para etapas mais avançadas (FERREIRA et al., 2016). A depender da técnica de cultivo utilizada, se isolado ou *in situ*, autores tem sugerido um meio base específico como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Demonstrativo do meio de cultivo utilizado de acordo com o método de cultivo e a espécie.

Método de cultivo	Meio de cultivo	Espécie	Autores
Folículos isolados	α -MEM	Ovelha	Mbemya et al. (2018)
	McCoy	Bovino	Mclaughlin et al. (2010)
	TCM 199	Bovino	da Cunha et al. (2018)
	DMEM	Bovino	Saeed-Zidane et al. (2017)
Folículos <i>in situ</i>	α -MEM	Bovino	Jimenez et al. (2018)
		Cabra	Guerreiro et al. (2019)
		Equino	Gastal et al. (2019)

Fonte: Autor

Dentre os meios disponíveis, o α -MEM tem sido apontado como meio ideal para cultivo *in situ* já que apresenta alterações nas concentrações de aminoácidos que o aproxima mais da composição proteica das células de mamíferos, já que apresenta, além do piruvato de sódio, todos os vinte e um aminoácidos essenciais, alguns em concentrações elevadas e cinco vitaminas adicionais (JIMENEZ et al., 2016). No entanto, embora o meio base seja composto por diversos fatores que permitem o desenvolvimento dos folículos, ainda se faz necessária a adição de substâncias que sejam capazes de influenciar a sobrevivência e o crescimento foliular, incluindo antibióticos, tampões, lipídios, proteínas, aminoácidos, vitaminas, além de hormônios e diversos fatores de crescimento (FIGUEIREDO et al., 2008) como apresentado na tabela 2.

Tabela 2. Substâncias rotineiramente utilizadas na suplementação do meio de base para cultivo *in situ* de tecido ovariano.

Constituintes do meio de cultivo <i>in situ</i>	Função	Autores
ITS	Antioxidante	Lins et al. (2017)
Ácido Ascórbico	Antioxidante	Barberino et al. (2015)
Hipoxantina	Purina relacionada à formação de ATP	Biasibetti-Brendler et al. (2018)
Glutamina	Substrato energético, fonte de C e N	Figueiredo et al. (2002)
BSA	Fonte de proteína	Rodrigues et al. (2010)
Penicilina, Estreptomina	Controle da contaminação microbiológica	Molinaro (2010)

Fonte: Autor

2.4. Criopreservação de tecidos e células

A técnica de criopreservação consiste na conservação do material biológico, por tempo indeterminado, a temperaturas negativas (-196°C) (RUBINSKY, 2003), para que, quando descongelado, esse material possa prosseguir seu desenvolvimento normal (PEGG, 2007). Segundo Sheikhi *et al.* (2011), nessa temperatura todas as reações químicas, processos biológicos, bem como as atividades intra e extracelulares são suspensas, permitindo, portanto, que uma célula ou tecido possam ser mantidos conservados indefinidamente (SHEIKHI et al., 2011).

O processo de criopreservação pode ser realizado por congelação lenta ou por congelação ultrarrápida, como a vitrificação, ambos baseados nos mesmos princípios de proteção das células contra danos criogênicos (MARQUES et al., 2019). No entanto, esses processos divergem entre si, principalmente, quanto à taxa de redução de temperatura empregada (RODRIGUES et al., 2012). A congelação lenta é caracterizada por uma redução gradual da temperatura e, por esse motivo, requer um procedimento de temperatura controlado e gradual (SANCHES, 2009). Já na vitrificação, os fluidos passam do estado líquido diretamente para um estado sólido amorfo denominado vítreo (MARQUES et al., 2019). Nesse processo os fluidos começam a se comportar como sólido durante o resfriamento, sem qualquer alteração substancial no arranjo molecular ou nas variáveis de estado termodinâmico (WOWK, 2010). Esse efeito é obtido graças à utilização de soluções crioprotetoras altamente concentradas (YAMAKI; PEDROSO; ATVARS, 2002). A vitrificação é importante para a criobiologia,

porque o estado natural da água líquida dentro dos seres vivos é desordenado, e a manutenção da desordem natural das moléculas de água e dos solutos dissolvidos no interior das células promovida pela vitrificação é vantajosa do ponto de vista de perturbar minimamente o sistema que está sendo preservado (WOWK, 2010).

Em termos de efetividade, Keros et al. (2009) compararam o processo de criopreservação de tecido ovariano por congelamento lento *versus* o vitrificado e observaram que ambos mantiveram a viabilidade oocitária, preservando a integridade morfológica do tecido ovariano humano. Somado a essas evidências, estudo conduzido por Terren et al. (2019) utilizando ovários de camundongos indicaram que as diferenças entre o congelamento lento e a vitrificação não são evidentes pela análise histo-morfológica do tecido criopreservado. Ainda, em análises imunohistoquímicas e de RT-qPCR para apoptose e proteínas foliculares específicas foram observadas alterações (TERREN et al., 2019). Além disso, os autores verificaram ainda que o autotransplante de ovários submetidos aos dois métodos restaurou completamente a fertilidade do camundongo.

Processos de criopreservação, no entanto, podem ocasionar danos celulares como a formação de gelo intracelular, o efeito solução, bem como o estresse oxidativo - principalmente através da peroxidação lipídica que ocorre na membrana da célula (LUZ et al., 2011; ROCHA et al., 2018; JYOTHI; KALAYANI; NACHIYAPPA.,2012). A formação de cristais de gelo no interior da célula é um fenômeno que ocorre durante a etapa de resfriamento do processo de congelamento devido a um estado de alta instabilidade provocado pelo superresfriamento da água intracelular como resultado da recristalização durante a descongelamento (FOREST et al.,2005). Trata-se de um fator responsável pela ruptura mecânica da membrana plasmática de células submetidas à criopreservação podendo, dessa forma, induzir a célula à morte por apoptose (ZHMAKIN, 2008; MOLINARO, 2010).

Já o efeito solução é caracterizado pela precipitação e aumento na concentração de eletrólitos e outros solutos em virtude da desidratação das células ou tecidos ocasionada pela redução acentuada da temperatura. Essas alterações podem atingir graus bastante elevados (ZHMAKIN, 2008), conseqüentemente, resultando em injúrias às proteínas intracelulares (JAIN; PAULSON, 2006.). Além desses eventos, o efeito solução também desencadeia alterações de pH (ZHMAKIN, 2008), perda de material de membrana e conseqüente redução das áreas de superfície celular (ELMOAZZEN, 2000).

Por sua vez, o estresse oxidativo, caracterizado por um aumento de EROS na célula ou tecido submetido à criopreservação, pode induzir danos em importantes biomoléculas celulares, incluindo lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (KASHKA; ZAVA-

REH; LASHKARBOLOUKI, 2016; LINS et al., 2017). Dentre os diversos efeitos deletérios, a membrana é um dos componentes celulares mais atingidos, em decorrência da oxidação dos ácidos graxos ou peroxidação lipídica que acarreta alterações na sua estrutura e permeabilidade. Esse efeito é definido como uma cascata de eventos que culmina com a deterioração oxidativa de lipídios presentes na membrana celular e, conseqüentemente, leva a transtornos da permeabilidade, alterando o fluxo de íons e outras substâncias, resultando na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas na célula (AYALA; MUÑOZ; ARGUELLES, 2014).

Por esses motivos, a fim de minimizar a peroxidação lipídica e outros danos causados pelo estresse oxidativo que ocorre durante o processo de criopreservação, é essencial que haja o equilíbrio entre agentes pró-oxidantes e os sistemas de defesa antioxidantes (BARBOSA et al., 2010). Além disso, para que não haja danos letais às células, é necessária a utilização de substâncias crioprotetoras, os denominados agentes crioprotetores (ACPs), os quais apresentam especificidade em sua função e concentração utilizada. Além dessa função protetora, a adição de ACPs em maiores concentrações é necessária para aumentar a viscosidade do meio e, dessa forma, atingir o estado vítreo característico dos protocolos de vitrificação (WOWK, 2010).

Os ACPs podem agir penetrando as células (crioprotetores intracelulares) ou agir protegendo as membranas (crioprotetores extracelulares). Os crioprotetores intracelulares são solventes orgânicos de baixo peso molecular (CASTRO et al., 2011) que, de forma geral, atuam substituindo parcialmente a água no interior da célula e ligam-se ao hidrogênio das moléculas de água intracelular, aumentando a viscosidade da solução de congelação, conseqüentemente, reduzindo o ponto de congelação da água (JAIN; PAULSON, 2006). Além disso, também agem prevenindo a exposição do material a altas concentrações de eletrólitos, através da ligação aos próprios eletrólitos ou pela substituição parcial pela água (CASTRO et al., 2011). Já os crioprotetores extracelulares, como a sacarose, atuam por meio da sua ligação às cabeças dos grupos fosfolipídicos aumentando a viscosidade do meio, ou diminuindo a concentração de eletrólitos durante a criopreservação, diminuindo, assim, o risco de danos osmóticos (HOVATTA, 2005; SANTOS et al., 2008; SHAW; WOOD; TROUNSON, 2000). Contudo, agentes crioprotetores podem ser tóxicos, bem como podem facilitar a entrada de agentes tóxicos nas células (SANTOS, 2006). Portanto, a escolha do crioprotetor e a sua concentração dependem do procedimento de criopreservação utilizado, da estrutura a ser criopreservada, bem como da espécie animal em questão.

De modo geral, como agentes crioprotetores intracelulares têm sido utilizados os seguintes: etilenoglicol (EG); propanodiol (PROH), glicerol (GLI) e dimetilsulfóxido (DMSO). Dentre eles, o DMSO tem sido utilizado com sucesso na criopreservação de tecido ovariano e gametas femininos (CASTRO et al., 2011). Em estudo com bovinos, Westphal et al. (2017) testaram o DMSO obtendo resultados promissores. Por ser um álcool dipolar, o DMSO é capaz de interagir ou combinar-se com ácidos nucleicos, carboidratos, lipídios e proteínas sem alterar de forma irreversível a configuração dessas biomoléculas e, além disso, esse composto é considerado relativamente atóxico (WUSTEMAN et al., 2008). A concentração final de DMSO mais frequentemente usada é de 10%, mas a literatura relata concentrações de 9%, 7,5%, 5% e menos de 5% (BAKKEN et al., 2003; SMAGUR et al., 2013). É importante considerar, no entanto, que o uso de baixas concentrações pode afetar a recuperação celular devido à fraca proteção promovida (LECCHI, et al., 2016).

Outro passo importante no protocolo de criopreservação é o procedimento da descongelação (RODRIGUES et al., 2014). Durante essa etapa, o reaquecimento do material congelado pode ocasionar injúrias celulares através do processo de recristalização ou ainda pelo crescimento dos microcristais de gelo que se formaram durante a congelação, tornando-se macrocristais, que podem levar à ruptura celular. Portanto, recomenda-se que o processo de descongelação seja suficientemente rápido (SANTOS 2000). Nesse caso, a amostra é retirada do nitrogênio líquido e exposta imediatamente à temperatura ambiente ou mergulhada em banho-maria (ASADA et al., 2000). Logo em seguida à descongelação é necessária a remoção dos crioprotetores que pode ser realizada através de uma ou várias lavagens do material criopreservado (SANTOS, et al., 2008). Esse procedimento é um fator que pode afetar a sobrevivência celular após descongelação, uma vez que, ao expor a célula com alta concentração de ACP a um meio com concentração deste agente baixa ou nula, a água tende a penetrar rapidamente na célula, causando aumento de volume ou até mesmo rompimento celular (FABBRI, 2006). Por esse motivo, é importante a presença na solução de remoção do crioprotetor de uma alta concentração de moléculas não penetrantes, como a sacarose, que contrabalança a alta concentração de crioprotetor na célula reduzindo, com isso, o choque osmótico e controlando o afluxo de água para o interior da celular (FABBRI, 2006).

Em termos de aplicabilidades práticas, para a medicina veterinária, a criopreservação de tecido ovariano tem uma grande importância, sobretudo para animais domésticos de alto valor genético que venham a óbito de forma inesperada (SHAW; WOOD; TROUNSON, 2000), linhagens de animais de laboratório geneticamente modificados, ou até mesmo para os programas de preservação de espécies ameaçadas de extinção (RODRIGUES et al., 2014).

Em humanos a técnica surge como estratégia promissora na preservação da fertilidade de mulheres com câncer ou com limitações de fertilidade que ocasionem falha ovariana prematura (LEE et al., 2019). Com essa finalidade, o passo seguinte após a criopreservação do tecido ovariano pode ser o transplante desses fragmentos ou o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais presentes no próprio ambiente ovariano ou mesmo isolados (RODRIGUES et al., 2002).

De fato, a criopreservação permite o armazenamento de células e/ou tecidos por tempo indeterminado, possibilitando que após a descongelação, esse material retorne ao seu metabolismo habitual e continue o seu desenvolvimento normal. Desta forma, o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais criopreservados no córtex do ovário (*in situ*) ou de forma isolada surge como uma alternativa tanto para verificar o potencial de desenvolvimento das células que foram criopreservadas, como para a obtenção de um grande número de oócitos fertilizáveis e obtenção de embriões produzidos *in vitro*, oriundos de animais de grande interesse genético, comercial ou para a biodiversidade que estejam impedidos de assumir a sua função reprodutiva ou mesmo após sua morte (RODRIGUES et al., 2012).

2.5. Adição de antioxidantes aos meios de cultivo *in vitro* e solução de vitrificação

Um aspecto importante a ser considerado é que, seja em condições de cultivo *in vitro* ou de criopreservação, a composição do meio para ambos apresenta grande importância (SMITZ; CORTVRINDT, 2002). Além das substâncias comumente utilizadas ao meio de cultivo e em protocolos de criopreservação, como apresentado anteriormente, a adição de outras substâncias se faz necessário. O enriquecimento do meio básico com substâncias antioxidantes, por exemplo, é fundamental para combater a formação de EROS que surgem tanto durante o processo de cultivo como de criopreservação (RAJABI-TOUSTANI et al., 2013).

Embora diferentes antioxidantes tenham sido rotineiramente adicionados ao meio básico de cultivo, como transferrina, selênio e ácido ascórbico, estudos têm sido desenvolvidos para testar os efeitos de outras substâncias com potencial antioxidante (LINS et al., 2017). Os resultados desses estudos têm demonstrado que muitas ervas e produtos vegetais apresentam atividade antioxidante o que levou a uma crescente demanda por substâncias fitoterápicas com essa propriedade (BEHMANESH et al., 2018).

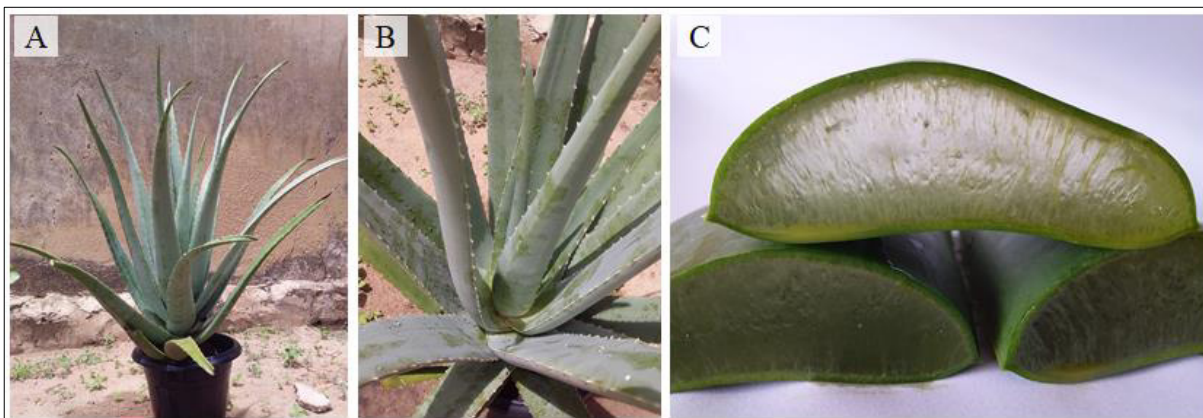
Neste sentido, diversos estudos já demonstraram a efetividade de substâncias naturais com propriedade antioxidante no cultivo de gametas femininos, como: extrato de *Justicia insularis* (MBEMYA et al., 2018); extrato de própolis vermelha (NASCIMENTO et al., 2018); rutina (LINS et al., 2017); extrato de *Amburana cearensis* (BARBERINO et al., 2015);

e frutalina (SILVA et al., 2018; SOARES-COSTA et al., 2018). Em protocolos de criopreservação, o resveratrol já apresentou efeito positivo contra o estresse oxidativo na vitrificação de tecido ovariano (ROCHA et al., 2018), e de embriões bovinos (MADRID GAVIRIA et al., 2019).

Esses resultados aumentaram o interesse na busca de novos compostos que possam ser utilizados como, por exemplo, o extrato da *Aloe vera* que tem apresentado efeito antioxidante em processos de criopreservação de células masculinas com aumento na eficiência e qualidade de espermatozoides pós-descongelamento (SOUZA, et al., 2016). Dessa forma, dada a sua ação antioxidante, apresenta-se como uma opção tanto para uso no meio de cultivo como em protocolos de criopreservação.

2.5.1. *Aloe vera*

Figura 4. Imagens da *Aloe vera* mostrando aspectos externos da planta (A, B) e corte transversal da folha mostrando o gel líquido e cristalino (C).



Fonte: Arquivo pessoal.

Aloe vera (Figura 4), pertencente à família Liliaceae, é uma suculenta ou xerófita perene sem haste ou com haste muito curta com folhas alongadas e pontiagudas nas quais grandes quantidades de água são armazenadas no tecido (BOUBREAU; BELAND, 2006). Seu extrato vem sendo utilizado como medicamento tradicional nas culturas árabe, chinesa, egípcia, grega, indiana, japonesa, coreana e romana por mais de 2000 anos para tratar empiricamente uma ampla lista de distúrbios e doenças (SÁNCHEZ-MACHADO et al., 2017). Além disso, tem sido utilizado como ingrediente em muitos produtos cosméticos desde 1986 e ganhou grande importância por suas diversas atividades terapêuticas. A planta contém mais de 75 compostos diferentes, incluindo vitaminas, minerais, enzimas, açúcares, antraquinonas ou compostos fenólicos, lignina, ácidos tânico, polissacarídeos, glicoproteínas, saponinas, este-

róis, aminoácidos e ácido salicílico (DAS et al., 2011). Na vasta composição do extrato de *Aloe vera* pode-se encontrar substâncias com propriedades antimicrobianas e de regeneração celular, requisitos importantes no cultivo celular (AIRES et al., 2003). Adicionalmente, já foi verificado que o extrato aquoso das folhas de *Aloe vera* contém componentes antioxidantes de ocorrência natural (tabela 3) (OZSOY; CANDOKEN; AKEV 2009), apresentando-se assim como uma alternativa no combate e atenuação do estresse oxidativo.

Tabela 3. Principais componentes da *Aloe vera*

Classe	Componentes
Aminoácidos	Alanina, arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, glicina, histidina, hidroxiprolina, isoleucina, fenilalanina, leucina lisina, metionina, prolina, tirosina, treonina, valina.
Antraquinona	Aloe-emodina, ácido aloético, aloína, antranol, barbaloina, emodina, ester de ácido cinâmico, isobarbaloina.
Carboidratos	Acemanana, acetilatedglucomannan, aldopentose, celulose, frutose, galactoglucoarabinomanana, galactogalacturana, glicose, glucogalactomanana, glucomanana, xilano.
Enzimas	Aliiase, amilase, carboxipeptidase, catalase, celulase, ciclooxidase, fosfatase alcalina, lipase, oxidase, peroxidase, superóxido dismutase.
Minerais	Cálcio, cloro, cobre, cromo, ferro, fósforo, magnésio, manganês, potássio, selênio, sódio, zinco.
Vitaminas	β -caroteno (A), ácido ascórbico (C), α -tocoferol (E) e complexo B (tiamina (B1), riboflavina (B2), piridoxina (B6), ácido fólico (B9) e colina).
Outras substâncias	Ácido salicílico, ácido úrico, colesterol, esteróides, giberelinas, lecitinas, lignina, triglicerídeos, β -sitosterol.

Fonte: Choi; Chung (2003); Surjushe et al., (2008); Pandey; Singh (2016).

O uso do extrato da *Aloe vera* na criopreservação de gametas masculinos de caitos (*Tayassu pecari*) aumentou a motilidade espermática em 50% após a descongelação (SOUZA et al., 2016), demonstrando também efeito positivo na criopreservação de sêmen em animais domésticos (AGUIAR et al., 2012). Além disso, em ratos, foi verificado um aumento da motilidade de espermatozoides e incremento no nível de testosterona, sugerindo que *Aloe vera* tem forte atividade espermatogênica, aumentando os parâmetros espermáticos (ESTAKHR; JAVDAN, 2011). Estudos realizados por Shahraki et al. (2014) demonstraram também que a *Aloe vera* tem efeito antioxidante, melhorando as características histológicas dos

testículos de ratos. Desta forma, acredita-se que a utilização do extrato do *Aloe vera* tanto na criopreservação de tecido ovariano, acrescentado aos crioprotetores, como no cultivo *in vitro* em adição ao meio permitiria um maior desenvolvimento folicular com manutenção da integridade morfológica do tecido e do folículo.

3. JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas continua tendo como objetivo a expansão da disponibilidade de gametas femininos, além de contribuir significativamente para a compreensão dos mecanismos pelos quais hormônios, fatores de crescimento, produtos naturais ou toxinas ambientais afetam a viabilidade e o desenvolvimento desses gametas (SHEA; WOODRUFF; SHIKANOV, 2014; DONFACK et al., 2018). Apesar dos avanços nas técnicas de reprodução assistida, o número de oócitos de folículos pré-antrais passíveis de utilização ainda é limitado, mesmo com um grande grupo de gametas presentes nos ovários mamíferos (BARBONI et al., 2011). Na espécie bovina, a produção de oócitos competentes à fase de fertilização *in vitro* ainda é pequena, principalmente devido a não elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na foliculogênese, sendo esta uma das principais questões relacionadas à biologia ovariana (ARAÚJO et al., 2014; BARBONI et al., 2011; SILVA et al., 2017). Nessa espécie, os resultados obtidos têm sido limitados à ativação de folículos primordiais e formação de folículos antrais a partir de pré-antrais (secundários) (ARAÚJO et al., 2014). Diante disso, é de fundamental importância o desenvolvimento de sistemas de cultivo *in vitro* que sejam capazes de suportar o crescimento folicular, mantendo as interações celulares necessárias para o desenvolvimento de folículos com crescimento prolongado (MCLAUGHLIN et al., 2010).

Aliada a isso, a biotécnica de criopreservação de tecido ovariano tem se apresentado como estratégia promissora para programas conservacionistas e de melhoramento genético, preservando gametas de espécies ou raças de animais em vias de extinção uma vez que a opção por criopreservar esse tecido ovariano permite a conservação de uma grande quantidade de gametas femininos de uma só vez. Além disso, folículos em estágio pré-antral têm apresentado maior resistência a baixas temperaturas quando comparados aos folículos antrais, o que permite melhor eficiência no armazenamento dessa população folicular (SANTOS et al., 2010; LIMA, et al., 2018). Em humanos, essa biotécnica têm sido apontada como promissora para a restauração da fertilidade em mulheres submetidas à rádio ou quimioterapia ou com risco de falha ovariana prematura (SANTOS et al., 2006) e para o desenvolvimento de protocolos ideais, dadas as limitações éticas e práticas para obtenção de ovários humanos, têm se recorrido a modelos bovinos dadas as similaridades entre esses ovários e os ovários humanos (WESPHAL et al., 2017).

No entanto, tanto sistemas de cultivo como protocolos de criopreservação enfrentam desafios. Ambos os protocolos favorecem o estresse oxidativo diminuindo a proteção

antioxidante das células (LINS et al., 2017; AGARWAL et al., 2006). Estes efeitos, no entanto, podem ser reduzidos ou evitados com a adição de substâncias ao meio crioprotetor e/ou ao meio de cultivo, que permitirão preservar células vivas a temperaturas extremamente baixas, bem como o seu desenvolvimento e crescimento durante o cultivo *in vitro*. Neste sentido, muitos pesquisadores têm buscado o aperfeiçoamento destas técnicas com a adição de substâncias, extratos de plantas, por exemplo, que apresentem em sua composição, nutrientes necessários para o melhoramento de tal processo. A ação antioxidante está entre os efeitos mais importantes para protocolos de criopreservação e cultivo de células e tecidos. Neste sentido, o extrato da *Aloe vera*, que apresenta em sua composição componentes antioxidantes de ocorrência natural, incluindo fenóis totais, flavonoides, ácido ascórbico, β -caroteno e α -tocoferol apresenta-se com grande potencial na adição de meios de cultivo e de criopreservação. Além disso, podem-se encontrar no extrato da *Aloe vera*, substâncias com propriedades antimicrobianas e de regeneração celular requisitos importantes no cultivo celular (AIRES et al., 2003).

4. HIPÓTESES

- A adição do extrato de *Aloe vera* ao meio de cultivo *in vitro* de tecido ovariano bovino proporciona ativação e desenvolvimento folicular mantendo a morfologia adequada da célula e do tecido.
- A adição do extrato de *Aloe vera* à solução de vitrificação de tecido ovariano bovino mantém a morfologia do folículo e do tecido, preservando a viabilidade folicular, permitindo a ativação e desenvolvimento do mesmo após a descongelação.
- A adição do extrato de *Aloe vera* à solução de vitrificação de tecido ovariano bovino promove a expressão dos genes antioxidantes *SOD*, *CAT*, *PRDX6* e *GPXI* após descongelação.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito da adição do extrato de *Aloe vera* em protocolos de cultivo *in vitro* e de vitrificação de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano de bovinos.

5.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito das diferentes concentrações de *Aloe vera* (0%, 1%, 5%, 10% ou 50%) no cultivo *in vitro* de tecido ovariano de bovinos sobre a morfologia da célula e do tecido, ativação e desenvolvimento folicular.
- Avaliar o efeito da adição da *Aloe vera* (10 ou 50%) na solução de vitrificação de tecido ovariano bovino sobre a morfologia celular e tecidual e viabilidade folicular após o aquecimento bem como sobre a ativação e desenvolvimento de folículos após a descongelação.
- Avaliar o efeito da adição da *Aloe vera* (10 ou 50%) na solução de vitrificação sobre a expressão dos genes de defesa antioxidante *SOD*, *CAT*, *PRDX6* e *GPXI* após o aquecimento.

6. CAPÍTULO 1

Influência das espécies reativas de oxigênio no cultivo *in vitro* de gametas femininos de mamíferos domésticos

Influência das espécies reativas de oxigênio no cultivo *in vitro* de gametas femininos de mamíferos domésticos

Francisco das Chagas Costa¹, Erlândia Márcia Vasconcelos¹, José Roberto Viana Silva¹ e Ana Liza Paz Souza Batista^{1*}

Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia da Reprodução – LABIREP – Núcleo de Biotecnologia de Sobral – NUBIS - Universidade Federal do Ceara, Sobral, CE, Brasil

*Endereço para correspondência: ALPS Batista, Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral, Av. Comandante Maurocélvio Rocha Ponte, 100, CEP 62042-280, Sobral, CE, Brasil.

E-mail: analizabatista@gmail.com

RESUMO

Os sistemas de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais e de complexos cúmulus-oócitos (COCs) se tornaram uma poderosa ferramenta capaz de subsidiar diversas técnicas reprodutivas com o fornecimento de um maior número de oócitos aptos à produção de embriões, bem como possibilitar estudos do efeito de diversas substâncias sobre a dinâmica folicular. No entanto, esses sistemas podem favorecer o estresse oxidativo e a diminuição da proteção antioxidante das células, distúrbio que está associado a altas taxas de atresia observada nos cultivos o que compromete a viabilidade dos folículos cultivados. Nesse sentido, para contornar esses efeitos adversos, a adição de substâncias antioxidantes aos meios de cultivo tem sido proposta. Abrangendo diferentes classes e mecanismos de ação, esses compostos antioxidantes têm por função interferir no processo de oxidação para inibir ou retardar o dano oxidativo causado pelos radicais livres às biomoléculas. Além de antioxidantes que têm sido rotineiramente utilizados com esse propósito, recentemente, substâncias alternativas de origem natural como extratos vegetais e óleos essenciais têm ganhado destaque, sendo objeto de estudos de muitos pesquisadores. Dessa forma, tendo em vista a influência do estresse oxidativo e a importância do uso de antioxidantes no cultivo celular, a presente revisão objetiva abordar os principais mecanismos de síntese e atuação dos radicais livres bem como o papel dos antioxidantes em protocolos de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos em animais domésticos.

Palavras-chave: Cultivo *in vitro*. Folículos ovarianos. Estresse oxidativo. Antioxidantes.

ABSTRACT

In vitro culture systems for female gametes have become a powerful tool capable of subsidizing several reproductive biotechniques with the supply of a greater number of oocytes capable of embryo production as well as enabling studies of the effect of various substances on follicular dynamics. However, these systems can favor oxidative stress and decrease the antioxidant protection of cells, a disorder that is associated with high rates of atresia observed in cultures, which compromises the viability of cultured follicles. In this sense, to circumvent these adverse effects, the addition of anti-oxidant substances to the culture media has been proposed. Covering different classes and mechanisms of action, these antioxidant compounds have the function of interfering in the oxidation process to inhibit or delay the oxidative damage caused by free radicals to biomolecules. In addition to antioxidants that have been routinely used for this purpose, recently, alternative substances of natural origin such as plant extracts and essential oils have gained prominence, being the subject of studies by many researchers. Thus, in view of the influence of oxidative stress and the importance of using antioxidants in cell culture, this review aims to address the main mechanisms of synthesis and action of free radicals as well as the role of antioxidants in *in vitro* culture protocols of ovarian follicles of domestic animals.

Keywords: *In vitro* culture. Ovarian follicles. Oxidative stress. Antioxidants.

1. INTRODUÇÃO

A formação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) em condições *in vivo* é um processo fisiológico e de grande importância, sendo gerado durante a divisão celular e o metabolismo de organismos (LI et al., 2017). No entanto, a sua produção em excesso pode trazer sérios danos, ocasionando o estresse oxidativo (SIES, 2015). Sua formação, seja durante o processo normal ou de forma exacerbada, é desencadeada, tipicamente, durante o processo de redução de oxigênio no interior da mitocôndria (SILVA et al., 2011). Em determinadas condições, as EROS podem ocasionar a peroxidação lipídica bem como a morte de células (TSIKAS, 2017). Para evitar os danos decorrentes da ação de EROS, os sistemas vivos desenvolveram mecanismos de defesa antioxidantes que têm como objetivo limitar os níveis intracelulares de tais espécies reativas e controlar a ocorrência de danos, mantendo, dessa forma, o equilíbrio redox do ambiente celular (BARBOSA et al., 2010). Quando, no entanto, o equilíbrio entre a formação de radicais livres e substâncias antioxidantes é desfeito, tem-se o estresse oxidativo (SIES, 2015).

Em situações de cultivo *in vitro*, o estresse oxidativo é ocasionado quando a taxa de produção dos compostos oxidantes é maior que a eliminação deles pelos sistemas de defesa antioxidantes naturais ocasionando um desequilíbrio metabólico com influência prejudicial nos tecidos e células (STIER et al., 2012). Esse distúrbio que está associado a altas taxas de atresia observada nos cultivos, o que compromete severamente a qualidade dos folículos cultivados (SAEED-ZIDANE et al., 2017). Alguns dos muitos efeitos conhecidos da formação aumentada de EROS em sistemas biológicos incluem a peroxidação de membranas lipídicas, dano oxidativo de ácidos nucleicos e carboidratos e ainda a oxidação de grupos sulfidrilas nas proteínas (DORNAS, et al., 2007). Esses eventos resultam em mau funcionamento do DNA, perda da integridade da membrana e disfunção mitocondrial (WU et al., 2011). Pesquisas têm revelado que o estresse oxidativo pode, ainda, ativar importantes vias indutoras de apoptose celular, além de regular positivamente o nível de expressão de proteínas pró-apoptóticas resultando, dessa forma, no comprometimento da estrutura de folículos submetidos a protocolos de cultivo *in vitro* (HORI et al., 2013).

Para contornar os efeitos deletérios inerentes ao estresse oxidativo ocasionado pelos sistemas de cultivo, diferentes estratégias têm sido propostas, como a adição de substâncias antioxidantes aos meios, tais como a glutatona (YOSHIHARA et al., 2009), melatonina (TANABE et al., 2015), transferrina, selênio e ácido ascórbico (LUZ et al., 2013; SANTOS et al., 2014). Abrangendo diferentes classes e mecanismos de ação, os antioxidantes têm por

função interferir no processo de oxidação com a finalidade de inibir ou retardar o dano oxidativo causado pelos radicais livres às biomoléculas, promovendo isso por meio da inativação ou estabilização desses radicais (OROIAN, ESCRICHE, 2015; SOUSA et al., 2007; RIBEIRO et al., 2005). Além desses antioxidantes que têm sido rotineiramente utilizados no cultivo de folículos ovarianos, recentemente, a busca de substâncias alternativas como a rutina (LINS et al., 2017) e o resveratrol (ROCHA et al., 2018) tem ganhado destaque, sendo objeto de estudo de muitos pesquisadores (KAUR; MUTHURAMAN, 2016; WANG et al., 2014).

Outro grupo de compostos que têm sido objeto de estudos são os óleos essenciais obtidos a partir de plantas. Esses compostos são caracterizados por possuírem uma ampla variedade de componentes bioativos, razão pela qual têm atraído interesse no seu uso para diversas finalidades, incluindo ação antioxidante (CARNEIRO et al., 2017). O alto potencial antioxidante dos óleos essenciais está relacionado à presença de metabólitos secundários como compostos fenólicos e seus derivados os quais estão intimamente relacionados com a eliminação de radicais livres, principalmente devido à presença de grupos hidroxila nas suas estruturas, tornando-os potenciais agentes redutores através da doação de hidrogênios (AQUINO et al., 2017; GHAFARI et al., 2018).

Dessa forma, tendo em vista a influência do estresse oxidativo e a importância do uso de antioxidantes no cultivo celular, a presente revisão objetiva abordar os principais mecanismos de síntese e atuação dos radicais livres bem como o papel dos antioxidantes em protocolos de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos de fêmeas domésticas.

2. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Os radicais livres são espécies químicas constituídas por um átomo ou associação de átomos que apresentam um ou mais elétrons não pareados em sua órbita mais externa, apresentando alta instabilidade energética e cinética já que, para permanecerem estáveis, precisam doar ou retirar um elétron de outra molécula (VALKO et al., 2007). Sua síntese pode ocorrer a partir do oxigênio, do nitrogênio, do carbono ou do enxofre. Quando sua síntese é derivada do oxigênio são denominados de espécies reativas do oxigênio (EROS) e são as mais relevantes, pois sua formação é desencadeada durante o processo normal da redução de oxigênio no interior da mitocôndria (SILVA et al., 2011).

As espécies reativas de oxigênio são normalmente produzidas nas células de organismos vivos como resultado do metabolismo celular normal e são fundamentais para a manutenção da homeostase celular (CENINI; LLORET; CASCLLA, 2019). Em condições

fisiológicas, concentrações baixas a moderadas de EROS estão envolvidas em processos como resposta imune, inflamação, plasticidade sináptica, aprendizado e memória (KISHIDA; KLANN, 2007). Além disso, podem atuar como segundos mensageiros celulares para regular vias de transdução de sinal que levam ao controle da expressão gênica e às alterações pós-traducionais de proteínas envolvidas em funções celulares, crescimento, diferenciação e morte celular (ALLEN; TRESINE, 2000). No ovário mamífero as EROS possuem participação importante na proliferação celular (RAHIMI et al., 2003), maturação oocitária (HAMMADEH et al., 2008), luteólise (SUGINO et al., 2000), esteroidogênese folicular e luteal, ovulação, fertilização, implantação e desenvolvimento embrionário inicial (AGARWAL; ALLAMANENI, 2004; FUJII et al., 2005). Portanto, sua produção em proporções adequadas é fisiologicamente importante, porém, a produção excessiva pode conduzir a danos oxidativos (FILIPOVIC et al., 2015). Por esse motivo, em condições fisiológicas, as EROS e sistemas antioxidantes naturais encontram-se em uma situação de equilíbrio. Quando este equilíbrio é quebrado e uma quantidade excessiva de EROS é produzida e liberada sem a correspondente degradação pelos agentes antioxidantes ocorre o estresse oxidativo (ANDRADE et al., 2010).

Nas células, essa perda do equilíbrio redox pode ser desencadeada por espécies reativas oriundas das mais diversas fontes (Tabela 1) e podem, didaticamente, ser divididas em duas categorias: espécies radicalares e não radicalares. As espécies radicalares são caracterizadas pela capacidade de atuarem como doadoras ou aceptoras de elétrons criando alterações no ambiente molecular ao seu redor. Nesse grupo incluem-se hidroxila, superóxido, peroxila e alcóxila. Já as espécies não radicalares, representadas pelo oxigênio singleto, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso não possuem elétrons livres, mas também podem reagir com moléculas ao seu redor ocasionando os mais variados efeitos adversos (MARTELLI; NUNES, 2014; BARREIROS et al., 2006; TORTORA et al., 2012).

Tabela 1. Principais espécies reativas de oxigênio

EROS	Estrutura química	Descrição	Ocorrência
Hidroxila	HO•	Altamente reativo	Formado a partir da hemólise da água
Radical superóxido	O ₂ ^{•-}	Altamente potente na indução de dano celular	Praticamente em todas as células aeróbicas
Peroxila	ROO•	Agente importante na oxidação do DNA e lipídios	Formado a partir da oxidação não enzimática de lipídios
Alcoxila	RO•	Envolvidos em muitas reações em cadeia, incluindo a peroxidação lipídica	Pode ser formado a partir da conversão de hidroperóxidos lipídicos (ROOH)
Oxigênio singleto	¹ O ₂	Molécula excitada de oxigênio. Não é um radical livre por não possuir elétrons desemparelhados na última camada	Produzido por fagócitos, indução luminosa e reações catalisadas pelas peroxidases

Peróxido de hidrogênio	H ₂ O ₂	Não é um radical livre por não apresentar elétrons desemparelhados na última camada	Reações para produção de HO•
Ácido hipocloroso	HClO	Molécula altamente tóxica que reage com biomoléculas essenciais causando danos oxidativos, incluindo peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas	Sintetizado por mieloperoxidasas nos neutrófilos a partir de H ₂ O ₂ e cloreto

Fonte: Adaptado de Oliveira & Schoffen (2010) e Goemans; Colar (2019)

A nível celular, os efeitos de espécies reativas podem variar desde a morte celular devido a danos generalizados a macromoléculas, até efeitos mais sutis no metabolismo celular, morfologia ou vias de sinalização (MARTINDALE; HOLBROOK, 2002). O impacto global das EROS na função celular varia com as espécies reativas, mas também pode ser afetado pelo tipo de célula, níveis de antioxidantes endógenos e enzimas antioxidantes, estado de diferenciação bem como o ambiente extracelular (JONES; GO, 2010). Dessa forma, alguns dos muitos efeitos conhecidos da formação aumentada de EROS em sistemas biológicos incluem o dano oxidativo ao DNA, alterações na homeostase iônica intracelular, peroxidação de membranas lipídicas bem como oxidação de proteínas e carboidratos (WANG, et al., 2019; AKBARALI, 2014).

- *Dano oxidativo ao DNA*

EROS são uma das principais fontes de dano ao DNA, pois podem modificar diretamente o DNA ou indiretamente gerar diferentes lesões, ambas afetando a viabilidade celular (COOKE et al., 2003). Entre as nucleobases, a guanina é a mais susceptível às EROS devido ao seu baixo potencial redox, e os principais produtos de sua oxidação são a 8-hidroxi guanina e a 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OHG e 8-OHdG), ambas são altamente mutagênicas e carcinogênicas, pois podem combinar tanto com a citosina quanto com a adenina, levando, assim, à transversões de GC para AT (NEELET; ESSIGMANN, 2006). Importante ressaltar, ainda, que diferentes produtos de oxidação no DNA podem resultar em diferentes tipos de mutações gênicas, com a ressalva de que a ocorrência da mutação depende da especificidade da eficiência do reparo do gene alvo (JIANG; JAMES, 2019).

O DNA mitocondrial (mtDNA) é particularmente vulnerável ao ataque de EROS devido à geração delas na Cadeia Transportadora de Elétrons (CTE) bem como à falta de proteção das histonas e a ausência ou mecanismos mínimos de reparo (COOKE; EVANS; DIZDAROGLU, 2003). A CTE produz radicais livres do oxigênio durante o seu funcionamento

normal e eles desempenham um papel importante na sinalização celular (DUNN; ALVAREZ; SOLDATI, 2015). No entanto, a extensão de EROS produzidas pode aumentar durante o mau funcionamento da CTE. Essas EROS extras são principalmente produzidas pelos complexos I e III da CTE no acoplamento com o vazamento de prótons induzido (NANAYAKKARA; WANG; YANG, 2019). Um pequeno desequilíbrio nas funções da CTE pode levar a um acúmulo transitório de EROS, o que pode danificar o mtDNA nos genes que codificam os componentes da CTE. A expressão desses genes danificados pode levar à síntese de proteínas da CTE com problemas, maior acúmulo de EROS e ainda mais danos maciços ao mtDNA em uma situação referida como “ciclo vicioso mitocondrial” (PINTO; MORAES, 2015).

- Homeostase iônica intracelular

Ainda como efeito deletério de EROS pode ocorrer perda da homeostase iônica intracelular por perturbações em canais iônicos causadas pelo acúmulo de radicais livres na célula. Esses canais iônicos são proteínas multiméricas localizadas na membrana plasmática e nos compartimentos celulares internos formando poros íon-seletivos que se abrem ou se fecham em resposta a estímulos específicos, como potencial de membrana, ligação a ligantes, temperatura e estímulos mecânicos (AKBARALI, 2014). EROS podem induzir diretamente modificações pós-traducionais de canais iônicos levando à oxidação de resíduos de aminoácidos específicos (grupos sulfidríla ou ligações dissulfeto envolvendo resíduos de cisteína) ou indiretamente modular a função do canal afetando as vias de sinalização que controlam a transcrição gênica (ANNUNZIATO et al., 2002).

No retículo endoplasmático (RE) um desequilíbrio de EROS pode induzir a liberação de Ca^{2+} levando à perda da homeostase desse íon na célula. Em condições fisiológicas normais a concentração de cálcio dentro do lúmen do RE é muito maior do que no citosol. Essa concentração é mantida por bombas no RE e é necessária para o correto funcionamento do mecanismo de dobragem de proteínas. As EROS são capazes de ativar canais de liberação de Ca^{2+} na membrana do retículo (HOOL; CORRY, 2007). A liberação resultante de Ca^{2+} do RE ativarão diversos processos sensíveis ao cálcio dentro da célula incluindo importantes vias de sinalização (HOOL; CORRY, 2007). Além disso, a perda da atividade das chaperonas resulta no acúmulo de proteínas mal dobradas dentro do lúmen, levando à geração adicional de EROS, na tentativa de redobrá-las (TU; WEISSMAN, 2004). O acúmulo também estimulará a resposta a proteínas mal enoveladas, um conjunto altamente conservado de vias de sinalização

que visam restaurar a homeostase, mas, se isso falhar, estimulará a apoptose (XU; BAILLY-MAITRE; REED, 2005; RON; WALTER, 2007).

O aumento na concentração do íon Ca^{2+} citosólico também afeta negativamente a função mitocondrial, incluindo um aumento na produção própria de ERO e a abertura do poro de transição de permeabilidade. Essa abertura é promovida sinergicamente pelo aumento de Ca^{2+} e oxidação dos grupos tiol nas proteínas da membrana mitocondrial interna (KOWAL-TOWSKI; CASTILLO; VERCESI, 2001). Como resultado, o potencial de membrana mitocondrial e a síntese de ATP colapsam. Se as mitocôndrias em toda a célula forem afetadas, as concentrações de ATP caem abruptamente, a homeostase iônica é perdida e a célula sofre necrose primária (BURTON; JAUNIAUX, 2011).

- Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica ocorre nas cadeias laterais dos ácidos graxos poli-insaturados da membrana plasmática ou de qualquer organela que contenha lipídios. Essas cadeias laterais reagem com o O_2 e criam o radical peroxila, que pode obter H^+ de outro ácido graxo, criando uma reação contínua (ABUJA; ALBERTINI, 2001). Isso acarreta severas alterações na estrutura e permeabilidade da membrana celular alterando o fluxo de íons e outras substâncias, resultando na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas na célula (AYALA; MUÑOZ; ARGUELLES, 2014). Além disso, a peroxidação lipídica gera um grupo heterogêneo de produtos finais relativamente estáveis, como malondialdeído (MDA), 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), acroleína e isoprostanos (REED, 2011). MDA, HNE e acroleína são capazes de ligar proteínas e DNA, levando à alteração da conformação e função (WINCZURA; ZDZALIK; TUDEK, 2012).

- Oxidação de proteínas e carboidratos

As proteínas também são expostas a ataques de EROS, ocasionando modificações de aminoácidos sítio-específicos, fragmentação da cadeia peptídica, agregação de produtos de reação reticulados, carga elétrica alterada e aumento da suscetibilidade das proteínas à proteólise (MOLLER; KRISTENSEN, 2004). Nas enzimas, as alterações no nível de aminoácidos tendem a resultar em alterações de estrutura e conseqüentemente da função enzimática levando a alterações funcionais que perturbam o metabolismo celular (KADA et al., 2017).

Carboidratos também podem ser afetados por EROS, onde a oxidação de açúcares gera compostos dicarbonílicos intermediários altamente reativos, como na glicólise e na auto-oxidação da glicose, gerando o metilgloxal e o gloxal. Esses produtos possuem grupos carbonílicos reativos que se condensam aos grupos de amina primárias e geram os produtos finais de glicação avançada (AGEs) (VISTOLI, et al., 2013; CENINI, LLORET; GENUTH, 2005). Os mecanismos básicos pelos quais os AGEs danificam as células compreendem a modificação de estruturas intracelulares, incluindo as que participam da transcrição gênica; interações com proteínas da matriz extracelular, mudando a sinalização entre a matriz e a célula, gerando falhas nas funções e na estrutura do tecido afetado. Além disso, pode ainda ocorrer modificação de proteínas ou lipídeos plasmáticos (BROWNLEE, 2005).

Como visto, espécies reativas de oxigênio correspondem a um importante fator capaz de limitar e/ou impossibilitar a manutenção da viabilidade de células sob condições de estresse oxidativo. Dito isso, verifica-se a necessidade de uma explanação mais específica acerca da influência desse estresse em sistemas de cultivo de gametas femininos.

3. INFLUÊNCIA DO ESTRESSE OXIDATIVO NO CULTIVO *IN VITRO* DE GAMETAS FEMININOS

O sucesso do cultivo *in vitro*, envolve a adição de diversas substâncias visando, oferecer um ambiente mais próximo do que seria *in vivo*. No entanto, fatores como a procedência dos ovários, suplementação dos meios de cultivo e o estresse oxidativo, influenciam o sucesso da foliculogênese *in vitro* (SILVA et al., 2015; SÁ et al., 2018). O estresse oxidativo pode provocar danos à fisiologia do ovário de mamíferos e desencadear várias vias de morte celular no ovário, onde, tanto em oócito quanto em células da granulosa já foi relatada a ocorrência de apoptose, autofagia e necrose em decorrência do estresse oxidativo (CHAUDHARY et al., 2019).

O cultivo do tecido ovariano apresenta inúmeras vantagens, uma vez que os folículos presentes podem ser mantidos no ambiente natural. No entanto, o sucesso dos atuais sistemas de cultivo ainda é insatisfatório, sendo limitado à baixa eficiência de sobrevivência a longo prazo do crescimento de folículos primordiais e primários (GUZEL; OKTEM, 2017; CHANDRA; SAMALI; ORRENIUS, 2000). Um dos fatores que pode influenciar no sucesso do cultivo *in vitro* é o estresse oxidativo visto que, de acordo com Massignam et al. (2018), qualquer manipulação de tecidos e células pode levar à produção excessiva de EROS, provocando danos celulares e teciduais e, eventualmente, morte celular. De fato, o cultivo *in vitro*

de fragmentos de tecido ovariano ocasiona uma maior formação de espécies reativas, havendo, assim a necessidade de se utilizar substâncias antioxidantes que promovam um equilíbrio na produção de EROS (SILVA et al., 2011). Um dano importante causado pelo estresse oxidativo é a quebra do DNA no momento da replicação, prejudicando a polimerização do DNA, resultando em degeneração, morte celular e conseqüentemente em danos teciduais (COX et al., 2000).

O cultivo *in vitro* de folículos ovarianos isolados também sofre ação negativa do estresse oxidativo que é ocasionado pela manipulação, ausência de mecanismos fisiológicos de proteção às células e pelo aumento dos níveis de oxigênio no meio celular, promovendo assim, uma baixa produção de oócitos competentes para etapas subseqüentes como a fertilização *in vitro* (SÁ et al., 2018). Folículos cultivados *in vitro* apresentam menor capacidade de desenvolvimento quando comparados aos crescidos no ambiente fisiológico. Isso porque, em condições *in vitro*, os folículos podem ser expostos a concentrações de oxigênio superiores às fisiológicas (20%) (SÁ et al., 2018). Além disso, a produção de subprodutos da peroxidação lipídica como o malondialdeído (MDA) pode ainda provocar reações destes com outros componentes celulares incluindo proteínas e ácidos nucleicos e levar à disfunção da célula (KASHKA et al., 2016; HALLIWELL, 2014).

O estresse oxidativo também provoca danos às células da granulosa, que podem apresentar crescimento anormal e perda da função, levando essas células à apoptose, e, por conseguinte, à atresia folicular (ZHANG et al., 2016; LI et al., 2016; LEE et al., 2013). As mitocôndrias são as primeiras organelas a sofrerem degeneração visto serem o local onde são produzidos os radicais de oxigênio e, assim, o dano provocado a essas organelas pelas EROS leva à degeneração das células da granulosa e a uma diminuição na qualidade do folículo ovariano (SHI et al., 2016). Estudos demonstraram que a apoptose induzida pelo estresse oxidativo em células da granulosa resulta na redução dos níveis de estradiol e em atresia folicular (GHATEBI et al., 2019). Foi observado que, o estresse oxidativo, é capaz de interromper a comunicação entre oócitos e células da granulosa promovendo uma diminuição da qualidade oocitária (CHAUBE et al., 2014). Evidências apontam ainda que as EROS são capazes de induzir várias vias de apoptose mitocondrial através da ativação de receptores de morte localizados nas membranas celulares, ocorrendo assim, a indução da proteína quinase ativadora de mitógenos e da via das caspases (CHANDRA et al., 2000).

O estresse oxidativo é o responsável primário pelo declínio da qualidade dos oócitos em função da idade, através da acumulação de danos causado às mitocôndrias durante o metabolismo biológico diário (BENTOV et al., 2011). Assim, distúrbios na função mitocon-

drial e outros fatores como o estresse do retículo endoplasmático e redução da capacidade antioxidante podem estar envolvidos na progressão do envelhecimento oocitário (ZHANG et al., 2019). Importante ressaltar, no entanto, que, em condições normais, as espécies reativas de oxigênio desempenham funções essenciais para o desenvolvimento do oócito e para o processo de ovulação (RIZZO et al., 2012). De acordo com Chaudhary et al. (2019), níveis moderados de EROs, desencadeiam a retomada meiótica do oócito da fase de diploteno, bem como a parada em M-II, e a suplementação do meio com antioxidantes inibe a retomada espontânea sob condições de cultivo *in vitro*.

Assim, apesar de as EROs serem um produto normal do metabolismo celular, o seu excesso provoca danos ao DNA, disfunção mitocondrial e modificação da oxidação de proteínas, isso resulta em baixa qualidade de oócitos e bloqueio do seu potencial de desenvolvimento (TAMURA *et al.*, 2008; RAJANI *et al.*, 2012). Dado isso, a suplementação dos meios com substâncias antioxidantes, é etapa fundamental em protocolos dessa natureza, com o propósito de minimizar os danos advindos do estresse oxidativo.

4. ANTIOXIDANTES UTILIZADOS NO CULTIVO *IN VITRO*

A composição dos meios de cultivo de folículos ovarianos é um fator chave para promover o adequado desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais para etapas mais avançadas (FERREIRA et al., 2016). Um ambiente equilibrado de oxigênio deve ser considerado, devido ao efeito danoso do estresse oxidativo. Dessa forma, embora certa concentração de EROS seja necessária para que várias vias metabólicas funcionem, é importante a manutenção de um equilíbrio na produção desses compostos tendo em vista seus efeitos deletérios sobre células da granulosa, fertilização oocitária e desenvolvimento embrionário posterior (AGARWALL; ALLAMANENI, 2004; BEDAIWY, et al., 2004). Portanto, a adição de antioxidantes ao meio de cultivo é necessária para prevenir ou diminuir o dano induzido pelo estresse oxidativo *in vitro* e, por esse motivo, diferentes componentes antioxidantes têm sido rotineiramente adicionados em meios de cultivo de células e tecidos ovarianos como transferina, selênio e ácido ascórbico (LUZ, et al., 2013; SANTOS, et al., 2014). A utilização destas substâncias já é bastante difundida apresentando resultados satisfatórios, no entanto, encarecem os sistemas de cultivo e não suprem com total efetividade as necessidades antioxidantes observadas nesses sistemas. Por esse motivo, fica evidente a necessidade da realização de estudos que objetivem a prospecção e caracterização de compostos alternativos, principalmen-

te aqueles de origem natural, que possuam eficácia na manutenção do equilíbrio redox e que, além disso, sejam de baixo custo.

- *Antioxidantes de origem vegetal*

Compostos naturais presentes em plantas medicinais têm sido considerados uma estratégia promissora e de baixo custo na busca por fontes alternativas de suplementos com atividade contra o estresse oxidativo (BARBERINO et al., 2015; CAVALCANTE et al., 2017). Nesse contexto, os extratos vegetais têm ganhado destaque por possuírem uma grande variedade de moléculas sequestradoras de radicais livres, como flavonoides, antocianinas, carotenoides, glutathionina, vitaminas e metabólitos endógenos, sendo a maioria desses compostos derivados do metabolismo secundário das plantas (CHOI et al., 2002; MAIA, 2008). Essas características amplia o interesse na utilização desses compostos como potenciais inibidores do estresse oxidativo no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos em animais domésticos.

Além dos extratos, os óleos essenciais, caracterizados como compostos voláteis obtidos a partir de plantas e possuindo uma ampla variedade de compostos bioativos, também têm atraído o interesse no seu uso para diversas finalidades, incluindo proteção antioxidante (CARNEIRO et al., 2017). Entre os componentes químicos encontrados nessas substâncias pode-se citar os monoterpenos, triterpenos e sesquiterpenos, sendo os monoterpenos os componentes mais comuns em óleos essenciais (MORAIS et al., 2006; GHAFFARI; RAHIM-MALEK; SABZALIAN, 2018) e, assim como os extratos, possuem também importante teor de compostos fenólicos e derivados (AQUINO et al., 2017; GHAFFARI et al., 2018).

Entre todos os metabólitos potencialmente antioxidantes presentes nos extratos e óleos essenciais vegetais, os compostos fenólicos têm sido bastante difundidos. Esses compostos são caracterizados por ter pelo menos um anel aromático com um ou mais grupamentos hidroxila e variam de moléculas fenólicas simples a compostos altamente polimerizados. Sua biossíntese ocorre a partir da via dos fenilpropanoides e são frequentemente conjugados com açúcares, outros fenólicos e poliamidas (TORRAS-CLAVERIA et al., 2012; VALDERRAIN-RODRÍGUEZ et al., 2014). São compostos representados, principalmente, pelos flavonoides e taninos (AQUINO et al., 2017).

Os flavonoides compõem uma classe de componentes químicos que diferem entre si pela estrutura química, e apresentam diversas formas de ação antioxidante dada a sua capacidade em neutralizar os radicais livres ou quelar íons metálicos (AQUINO et al., 2017). A presença de grupos hidroxilas em sua estrutura promove a inibição das reações de oxidação

das espécies reativas de oxigênio por doarem átomos de hidrogênio às espécies, estabilizando-as e transformando-as em quinonas (substâncias pardas) (GHAFFARI et al., 2018). Por sua vez, ao quelar íons metálicos, ocorre a inibição da reação de Fenton, uma forma endógena de produzir espécies reativas (AQUINO et al., 2017). Além disso, os flavonoides podem, ainda, atuar como inibidores do sistema enzimático que é responsável pela formação de EROs a partir de enzimas como ciclooxigenase e lipoxigenase e podem atuar ainda por meio da indução de enzimas com propriedades antioxidantes, como a metalotioneína, que é capaz de quelar metais (BEHLING et al., 2006).

Nesse contexto, em estudo recente conduzido por Lins et al. (2017) verificou-se que a rutina, pertencente ao grupo dos flavonoides, foi capaz de aumentar a proteção antioxidante de folículos ovarianos ovinos cultivados por 12 dias pelo aumento nos níveis de GSH. Nesse estudo foi proposto que a rutina pode, então, ser utilizada como único antioxidante presente no meio base, substituindo a adição de transferrina, selênio e ácido ascórbico durante a cultura *in vitro* de folículos secundários ovinos por 12 dias. Em outro estudo, o resveratrol tem apresentado diversas atividades biológicas dentre elas, antioxidante (CABELLO et al., 2015; WANG et al., 2017). Como um antioxidante, o resveratrol protege a função mitocondrial pela ativação do gene da sirtuína-1 (SIRT1), encontrado nas células da granulosa, células do cúmulus, oócitos e blastocistos (WANG et al., 2014; MORITA et al., 2012). Em estudo de Rocha et al. (2017) demonstrou-se que o resveratrol foi capaz de manter parâmetros aceitáveis de ERO em tecido ovariano de bovinos. Somado a isso, já foi verificado que antocianinas, obtidas a partir de maçãs vermelhas, foram capazes de reduzir o estresse oxidativo em células da granulosa de suínos com importante repercussão no aumento da expressão de proteínas antiapoptóticas Bcl2, além da redução da proteína pro-apoptótica Bax (XIANG et al., 2017).

Além desses relatos, Gouveia et al. (2016) verificaram que a suplementação do meio base com extrato de *Amburana cearensis* associado ao FSH foi capaz de melhorar os níveis de GSH e mitocôndrias metabolicamente ativas em folículos caprinos cultivados *in vitro*, corroborando com achados de Barberino et al. (2015) que constataram que uma concentração adequada do extrato de *A. cearensis*, sem suplementação, mantém a sobrevivência folicular além de promover o desenvolvimento de folículos secundários isolados de ovinos *in vitro*.

Ainda, nesse contexto do potencial dos extratos vegetais como atenuadores do estresse oxidativo tem ganhado destaque a *Aloe vera* (AV). De fato, AV é uma planta perene e suculenta que apresenta em seu conteúdo sólido mais de 75 compostos potencialmente ativos diferentes, incluindo vitaminas, minerais, enzimas, vitaminas solúveis em água e em gorduras,

polissacarídeos simples e complexos, bem como compostos fenólicos e ácidos orgânicos. Essa composição faz com que a planta apresente diversas propriedades farmacológicas, dentre elas atividade antioxidante (SUMI et al., 2019; DAS et al., 2011). A atividade moduladora da AV ao estresse oxidativo tem sido atribuída à presença, no gel da planta, de quantidades substanciais de compostos antioxidantes, incluindo α -tocoferol (vitamina E), carotenoides, ácido ascórbico (vitamina C), flavonoides e taninos, demonstrando o potencial de eliminação de vários radicais livre *in vitro* pelo gel de AV (CESAR et al., 2018). De acordo com Saini, (2011), o extrato da planta é capaz de eliminar os radicais livres 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), 2,2-azinobis- (ácido 3-etilbenzotiazolona-6-sulfônico) (ABTS) e óxido nítrico de maneira dependente da concentração. Além desse relatório, estudo recente conduzido por Sumi et al. (2019) demonstrou o efeito benéfico da AV sobre parâmetro de estresse oxidativo em ratos. Nessa investigação a AV foi capaz de aumentar a atividade de importantes enzimas antioxidantes como CAT e SOD, além do aumento de GSH no plasma e tecidos. Concomitante a esses resultados, uma diminuição expressiva do malondialdeído também foi observada. Em conjunto, os efeitos positivos da AV contra os efeitos deletérios do estresse oxidativo em outras espécies sugerem a potencialidade da utilização do extrato de AV como suplemento de meios de cultivo de gametas femininos visando ao equilíbrio redox celular.

Óleos essenciais também apresenta destaque em seu potencial antioxidante, como por exemplo o óleo essencial do gênero *Ocimum* (MORAIS et al., 2006). Nos extratos dessas plantas, foram identificados diversos compostos fenólicos, incluindo flavonoides, diterpenos fenólicos e ácidos fenólicos, os quais apresentam elevado efeito antioxidante (JAVANMARDI et al., 2003). Entre as espécies do gênero *Ocimum* encontra-se o manjeriço (*Ocimum basilicum* L.), presente em regiões tropicais e subtropicais do mundo (KHAKDAN et al., 2016). Análises demonstraram que os compostos fenólicos presentes no manjeriço são responsáveis pela sua ação antioxidante e podem ser encontrados em ácidos fenólicos, como o ácido rosmarínico, um derivado do ácido caféico (AGUIYI et al., 2000; MELO et al., 2006), que apresenta diversos efeitos farmacológicos, incluindo ação antioxidante, antiviral e anti-inflamatória (SWARUP et al., 2007; MEHNI; SHARIFIFAR; ANSARI, 2012). Arranz et al., 2015 demonstraram que o óleo bruto de manjeriço apresenta elevado potencial para utilização como um antioxidante natural em produtos alimentícios, sensíveis à oxidação lipídica, ou mesmo alimentos orgânicos. Kapewangolo et al, (2015) mostraram o potencial antioxidante e anti-inflamatório de *Ocimum labiatum*, encorajando o uso desse componente como uma fonte suplementar às terapias anti-inflamatórias e antioxidantes. Além disso, Fathiazad et al., (2012) relataram em seu estudo que os efeitos cardioprotetores de *ocimum* podem estar correlaciona-

dos com os seus compostos antioxidantes. Esses achados sugerem o potencial da utilização desses compostos como suplementos com propriedade antioxidante na otimização de sistemas de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De modo geral, fica evidente que a síntese de espécies reativas de oxigênio decorrente de procedimentos de cultivo *in vitro* de gametas femininos não pode ser evitada. No entanto, o excesso durante o período do cultivo pode ser superado através da utilização de compostos com atividade antioxidante capazes de modular positivamente os compartimentos celulares estabelecendo, então, proteção contra o estresse oxidativo decorrente. Por isso, a ampliação de conhecimentos acerca da influência do estresse oxidativo bem como sobre os benefícios proporcionados pela adição de antioxidantes sobre a viabilidade de gametas femininos de animais domésticos é de extrema importância para o direcionamento de trabalhos futuros que visem ao delineamento de protocolos alternativos de cultivo *in vitro*, viabilizando técnicas reprodutivas ao ponto de passarem a ser economicamente viáveis e empregadas de forma rotineira. É nesse sentido que avultam em importância estudos que promovam a prospecção e caracterização de substâncias de origem vegetal com atividade antioxidante, a exemplo dos extratos e óleos essenciais. De fato, esses compostos têm sido apontados como eficientes e, com isso, surgem como estratégia bastante promissora na atenuação do desequilíbrio redox de gametas femininos submetidos a cultivo *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ABUJA, P.M.; ALBERTINI R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. **Clin Chim Acta**, v. 306(1-2), p. 1-17, 2001.
- ADONA, P. R. et al. Ovogênese e Foliculogênese em Mamíferos. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde.**, v. 15 n. 3. p. 245-50, 2013
- AGARWAL, A. et al. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. **Reprod. Biol. Endocrinol.** V.10(49), 2012.
- AGARWAL, A.; ALLAMANENI, S.S.R. Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. **Reprod Biomed Online**, v.9, p.338-347, 2004
- AGUIYI, J.C. et al. Hyypoglycaemic activity of *Ocimum gratissimum* in rats. **Fitoterapia.**, v.71, n.4, p.444-6, 2000.
- ALLEN, R.G; TRESINI, M. Oxidative stress and gene regulation. **Free Radic Biol Med.** V.28, p: 463-99, 2000.
- ANDRADE, E. R. et al. Consequências da produção de espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 34, n. 2, p. 79-85, 2010.
- ANDRADE, E.R. Effects of ascorbic acid on in vitro culture of bovine preantral follicles. **Zygote**, v.20, p. 379–388, 2012.
- ANNUNZIATO, L. et al. Modulation of ion channels by reactive oxygen and nitrogen species: a pathophysiological role in brain aging? **Neurobiology of Aging**. v. 23(5), p.819–834, 2002.
- AQUINO, V. V. F. et al. Metabólitos Secundários e ação antioxidante de *Croton heliotripifolius* e *Croton blanchetianus*. **Acta Brasiliensis**, v. 1(3), p.7-10, 2017.
- ARRANZ, E.; et al. Supercritical fluid extraction as an alternative process to obtain essential oils with anti-inflammatory properties from marjoram and sweet basil. **Ind Crops Prod.**, v. 67, p. 121–129, 2015.
- ARECHIGA, C.G. et al. Effect of injection of β carotene or vitamin E and selenium on fertility of lactating dairy cows. **Theriogenology**,v.50, p.65-76, 1998.
- AYALA, A.; MUÑOZ, M.F.; ARGUELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, 2014.
- BARBERINO, R.S. et al. Amburana cearensis leaf extract maintains survival and promotes in vitro development of ovine secondary follicles. **Zygote**, v. 24, p. 277-285, 2015.
- BARBOSA, et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.** V.23, n.4, p. 629-643, 2010.

- BAR-OR, D.; GARRET, R. E. Is low plasma selenium concentration a true reflection of selenium deficiency and redox status in critically ill patients?. **Critical Care Medicine**, Baltimore, v. 39, p. 2000-2001, 2011.
- BARREIROS, A. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BEDAIWY, M.A et al. Differential growth of human embryos in vitro: role of reactive oxygen species **Fertil Steril**, v.82, p. 593-600, 2004.
- BEHLING, E.B et al. Comparative study of multiple dosage of quercetina against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rate kidneys. **Pharmacol. Rep.** v. 58(4), p. 526-532, 2006.
- BELLINGER, F.P. et al. Regulation and function of selenoproteínas in human disease. **Biochem. J.** v. 422, p. 11-22, 2009.
- BENTOV, Y. et al. The contribution of mitochondrial function to reproductive aging. **Journal of Assisted Reproduction and genetics**, v. 28(9), p. 773-783, 2011.
- BÉREZ, V. et al. Soluble transferrin receptor and mutations in hemochromatosis and transferrin genes in a general Catalan population. **Clinica Chimica Acta**. Elsevier. Espanha, v. 353, p. 205-208. 2005
- BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications. A unifying mechanism. **Diabetes**, v. 54, n. 6, p. 1615-1625, 2005.
- BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Oxidative Stress. Best Practice & Research. **Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 25(3), p. 287-299, 2011.
- CABISCOL, E.; ROS J. Oxidative damage to proteins: structural modifications and consequences in cell function. **Redox proteomics: From protein modification to cellular dysfunction and disease**. p.399-471, 2006.
- CABELLO, E. et al. Effects of resveratrol on ovarian response to controlled ovarian hyperstimulation in ob/ob mice. **Fertil Steril**. v.103, p.570-9, 2015.
- CANÇADO, R.D.; CHIATTONE, C.S. Anemia Ferropênica no adulto – causas, diagnóstico e tratamento. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. V. 32, nº3, p. 240-246. 2010.
- CARNEIRO, N. S. et al. Essential oil of flowers from eugenia klotzschiana (Myrtaceae): chemical composition and in vitro trypanocidal and cytotoxic activities. **Revista virtual de química**., v. 9, n. 3, p.1381-1392, 2017.
- CENINI, G; LLORET A.; CASCELLA, R. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: from a mitochondrial point of view. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2019.

- CESAR, V. et al. Cell-Type-Specific Modulation of Hydrogen Peroxide Cytotoxicity and 4-Hydroxynonenal Binding to Human Cellular Proteins In Vitro by Antioxidant Aloe vera Extract. **Antioxidants**, v. 7(10), 2018.
- CHANDRA, J.; SAMALI A.; ORRENIUS S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v.29, p.323-333, 2000.
- CHAUBE, S.K. et al. Clomiphene citrate induces ROS-mediated apoptosis in mammalian oocytes. **Open J Apoptosis**, v.3, p.52–58, 2014.
- CHAUDHARY, R. G. et al. Necroptosis in stressed ovary. **Journal of Biomedical Science**. v. 26, n. 11, 2019.
- CHEN, Q. et al. Ascorbate in pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, p. 8749-8754, 2007.
- CHEN, Z. et al. Effects of melatonin on maturation, histone acetylation, autophagy of porcine oocytes and subsequent embryonic development. **Animal Science Journal**, v. 88, n. 9, p.1298-1310, 2017.
- COOKE, M.S. et al. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. **FASEB J**. v.17(10), p. 1195-214, 2003.
- COX, M.M. et al. The importance of repairing stalled replication forks. **Nature**, v.404, p.37-41, 2000.
- DAS, S. *et al.* Isolation and characterization of novel protein with anti-fungal and anti-inflammatory properties from Aloe vera leaf gel. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.48, p. 38-43, 2011.
- DORNAS, W. C. *et al.* Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Rev. Ciên. Farm. Básica Apl.**, v. 28, nº 3, p. 241-249, 2007.
- DUNN, J.D., ALVAREZ L.A., ZHANG X., SOLDATI T. Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. **Redox Biol.** v.6, P. 472–485, 2015.
- FATHIAZAD, F. et al. Phytochemical screening and evaluation of cardioprotective activity of ethanolic extract of *Ocimum basilicum* L. (basil) against isoproterenol induced myocardial infarction in rats. **Daru Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 20, n.1, p.87–97, 2012.
- FERREIRA, A.C.A. et al. Balance of insulin and FSH concentrations improves the in vitro development of isolated goat preantral follicles in medium containing GH. **Animal Reproduction Science**, v. 165, p. 1-10, 2016.
- FILIPOVIC, M. et al. QSAR of the free radical scavenging potency of selected hydroxybenzoic acids and simple phenolics. **Comptes Rendus Chimie**, v. 18, n. 5, p.492-498, 2015.
- FINLEY, J. W. et al. Antioxidants in foods: state of the science important to the food industry. **The Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 6837-6846, 2011.

FUJII, J. et al. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. **Reprod Biol Endocrinol**, v.3, p.43, 2005.

GENUTH, S. et al. Glycation and carboxymethyllysine levels in skin collagen predict the risk of future 10-year progression of diabetic retinopathy and nephropathy in the diabetes control and complications trial and epidemiology of diabetes interventions and complications participants with type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 54(11), p. 3103-3111, 2005.

GHAFFARI, Z. et al. Variations in essential oil composition and antioxidant activity in *Perovskia abrotanoides* Karel collected from different regions in Iran. **Chemistry & Biodiversity**, v15(6), 2018.

GOEMANS, C.V; COLLET, J.F. Stress-induced chaperones: a first line of defense against the powerful oxidant hypochlorous acid. **F1000Research**, v. 8, 2019.

GOMES, R.G. et al. Alpha lipoic acid (ALA) effects on developmental competence of equine pré-antral follicles in short-term culture. **Theriogenology**, v. 105, p. 169-173, 2018.

GOMES, R.G. et al. Improvement of development of equine preantral follicles after six days of in vitro culture with ascorbic acid supplementation. **Theriogenology**, V. 84(5), p. 750-755, 2015.

GOMME, P.T; MCCANN, K.G; BERTOLINI, J. Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. **Drug Discovery today**, V. 10(4), P. 267-273, 2005.

GOUVEIA, B. B. et al. Supplemented base medium containing *Amburana cearensis* associated with FSH improves in vitro development of isolated goat preantral follicles. **Theriogenology**, v. 86, p. 1275–1284, 2016.

GRAZUL-BILSKA, A.T. et al. Cellular proliferation and vascularization in ovine fetal ovaries: effects of undernutrition and selenium in maternal diet. **Reproduction**, V.137, P. 699-707. 2009.

GUPTA, P.S.P.; RAMESH, H.S.; MANJUNATHA, B.M. Production of buffalo embryos using oocytes from in vitro grown preantral follicles. **Zygote**, v.16, p.57–63, 2008.

GUZEL, Y, OKTEM, O. Understanding follicle growth in vitro: Are we getting closer to obtaining mature oocytes from in vitro-grown follicles in human? **Mol Reprod Dev**. v.84, p. 544-559.

HALLIWELL, B. Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: avoiding pitfalls. **Biomed J.**, v. 37, n. 3, p. 99-105, 2014.

HAMMADEH, N. et al. Ultrasound-guided hydrosalpinx aspiration during oocyte collection improves outcome in IVF: a randomized controlled trial. **Hum Reprod**, v.23, p.1113-1117, 2008.

HORI, Y.S. et al., Regulation of FOXOs and p53 by SIRT1 Modulators under Oxidative Stress. **PLOS ONE**, v. 8(9), e73875, 2013.

HOOL, L.C.; CORRY B. Redox control of calcium channels: from mechanisms to therapeutic opportunities. **Antioxid Redox Signal**. V.9, p.409–435, 2007.

HUANG, J. Q. et al. Selenium deficiency disease exudative diathesis in chicks is associated with downregulation of seven common selenoprotein genes in liver and muscle. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, DOI: 10.3945/jn.111.145722, 2011.

JAVANMARDI, J. et al. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian Ocimum accessions. **Food chemistry**. v. 83, p. 547–550, 2003.

JIANG, D.; JAMES, F.R. Oxidation Chemistry of DNA and p53 Tumor Suppressor Gene. **Chemistry Open**, v. 8(3), P. 252-265, 2019.

JONES, D. P.; GO Y. M. Redox compartmentalization and cellular stress. **Diabetes Obes. Metab.** 12(Suppl 2), v.116, 2010.

KADA, S. et. al. Protective activity of *Hertia cheirifolia* extracts against DNA damage, lipid peroxidation and protein oxidation. **Pharmaceutical Biology**, v. 55(1), p. 330 – 337, 2017.

KHAKDAN, F. et al. The relationship between antioxidant compounds contents and antioxidant enzymes under waterdeficit stress in the three Iranian cultivars of basil (*Ocimum basilicum* L.). **Acta Physiol. Plant.** 2016. 38 226 10.1007/s11738-016-2241-4, 2016.

KASHKA, R. H.; ZAVAREH, S.; LASHKARBOLOUKI, T. Augmenting effect of vitrification on lipid peroxidation in mouse preantral follicle during cultivation: Modulation by coenzyme Q10. **Systems Biology In Reproductive Medicine**, [s.l.], v. 62, n. 6, p.404-414, 2016.

KAPEWANGOLO, P. et al. Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Ocimum labiatum* extract and isolated labdane diterpenoid. **Journal of inflammation**. v. 12, n. 4. 2015

KAUR, S.; MUTHURAMAN, A. Therapeutic evaluation of rutin in two-kidney oneclip model of renovascular hypertension in rat. **Life Sci**. v.150:89e94, 2016.

KISHIDA, K.; KLANN, E. Sources and targets of reactive oxygen species in synaptic plasticity and memory. **Antioxidants & Redox Signaling**. V.9(2), p.233–244, 2007.

KOHRLE, J. et al. Selenium, the thyroid, and the endocrine system. **Endocr. Rev.** v. 26, p. 944-984, 2005.

KOWALTOWSKI A.J.; CASTILHO R.F.; VERCESI A.E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Lett.** V.495, p.12–15, 2001.

LEE, L. et al. Changes in histone modification and DNA methylation of the StAR and *Cyp19a1* promoter regions in granulosa cells undergoing luteinization during ovulation in rats. **Endocrinology**. v.154, p. 458-470, 2013

LI, B. et al. Selection of antioxidants against ovarian oxidative stress in mouse model. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 31 (12), 2017.

LI, L. et al. The effect of heat stress on gene expression, synthesis of steroids, and apoptosis in bovine granulosa cells. **Cell Stress Chaperones.**, v.21, p. 467-475, 2016.

- LINS, T. L. B. G. et al. Rutin can replace the use of three other antioxidants in the culture medium, maintaining the viability of sheep isolated secondary follicles. **Theriogenology**, v. 89, p.263-270, 2017.
- LUTSENKO, E.A. et al. Vitamin C prevents DNA mutation induced by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 277, 16895–9
- LUZ, V.B. et al. Kit ligand and insulin-like growth factor I affect the in vitro development of ovine preantral follicles. **Small Rumin Res**, v.115:99e102, 2013.
- MAIA, C.N. Análise fitoquímica e atividade antibacteriana *in vitro* de extrato de plantas do Cerrado, Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros – MG, 2008.
- MARTELLI, F.; NUNES, F.M.F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Ciência e Cultura**, v.66 (3), p. 54-57, 2014.
- MARTINDALE J. L., HOLBROOK N. J. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J. Cell. Physiol.* V.192, 1–1510.1002/jcp.10119, 2002.
- MASSIGNAM, E. T. et al. Antioxidant defense capacity of ovarian tissue after vitrification in a metal closed system. **JBRA assisted reproduction**, v. 22(3), p.199–204, 2018.
- MEHNI, F.; SHARIFIFAR, F.; ANSARI, M. Antioxidant activity and rosmarinic acid content of ten medicinal plants. **Res. Pharm., Sci.** v.7, p.780, 2012
- MELO, A.S. et al. Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.1, p.24-30, 2006.
- MENEZES, V.G. et al. Effects of leptina on the follicular development and mitochondrial activity of ovine isolated early antral follicles cultures in vitro. **Theriogenology**, v.138, p. 77-83, 2019.
- MONTE, A.P.O. et al. Growth differentiation factor-9 improves development, mitochondrial activity and meiotic resumption of sheep oocytes after in vitro culture of secondary follicles. **Reprod. Domest. Anim.** V. 54(9), p. 1169-1176, 2019.
- MORAIS, S. M. et al. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de cróton do nordeste do Brasil. **Quim. Nova.**, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.
- MORITA, Y. et al. Resveratrol promotes expression of SIRT1 and StAR in rat ovarian granulosa cells: an implicative role of SIRT1 in the ovary. **Reprod Biol Endocrinol.** v.10(14), 2012.
- MOLLER, I.M; KRISTENSEN, B.K. Protein oxidation in plant mitochondria as a stress indicator. **Photochem Photobiol Sci.** V.3(8), p. 730-735, 2004.

NANAYAKKARA, G.K.; WANG, H.; YANG, X. Proton leak regulates mitochondrial reactive oxygen species generation in endothelial cell activation and inflammation—A novel concept. **Arch. Biochem. Biophys.** V.662:p.68–74, 2019.

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

OLIVEIRA, M. C.; SCHOFFEN, J. P. F. Oxidative stress action in cellular aging. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 6, p. 1333-1342, 2010.

OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International**, v.74, p. 10-36, 2015.

ÖZCAN, P. et al. Protective effect of resveratrol against oxidative damage to ovarian reserve in female Sprague-Dawley rats. **Reprod Biomed Online**, v.31, p. 404–410, 2015.

PANDEY, A.N.; CHAUBE, S.K. A moderate increase of hydrogen peroxide level is beneficial for spontaneous resumption of meiosis from diplotene arrest in rat oocytes cultured in vitro. **Bio Research Open Access**, v. 3(4), p. 183–191, 2014.

PAULINO, L.R.F.M. et al. Effects of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta on in vitro development of bovine secondary follicles. **Reprod Domest Anim.** V.53(4), P.997-1005, 2017.

PINTO, M.; MORAES, C.T. Mechanisms linking mtDNA damage and aging. **Free Radic Biol Med**, v. 85, p. 250-258, 2015.

QAZI, I.H. et al. Selenium, selenoproteínas and female reproduction: a review. **Molecules**, V. 23, 2018.

RAHIMI, G. et al. Effect of different vitrification protocols for human ovarian tissue on reactive oxygen species and apoptosis. **Reprod Fertil Dev**, v.15, p.343-349, 2003.

RAJANI, S. ET AL. Avaliação da qualidade do ovócito na síndrome do ovário policístico e endometriose por imagem de fuso e níveis de espécies reativas de oxigênio no fluido folicular e sua relação com resultados de IVF-ET . **Journal of Human Reproductive Sciences.** V.5, p.187-193, 2012.

REED, T. T. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. **Free Radical Biology and Medicine.** V.51(7), p.1302–1319, 2011.

RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas do oxigênio no meio biológico. **Biosci. J.**, Uberlândia, V. 21, n. 3, p. 133 – 149. Set./Dez. 2005.

RIZZO, A. et al. Roles of reactive oxygen species in female reproduction. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47(2), p. 344–352, 2012.

RON, D.; WALTER, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Nat Rev Mol Cell Biol.** V.8, p.519–529, 2007.

- ROCHA, C. D. Vitrificação de tecido ovariano de fetos bovinos associada ao resveratrol. 2017. 94 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/18468> >. Acesso em: 05 mai. 2018.
- ROSSETTO, R. et al. Interaction between ascorbic acid and follicle-stimulating hormone maintains follicular viability after long-term in vitro culture of caprine preantral follicles. **Domest. Anim. Endocrinol.** V.37, p. 112–123, 2009.
- RUDER, E.H. et al. Oxidative stress and antioxidants: exposure and impact on female fertility. **Hum Reprod Update.** V.14, p.345–357, 2008.
- SA, N.A.R. et al. Anethole reduces oxidative stress and improves in vitro survival and activation of primordial follicles. **Braz J Med Biol Res**, v. 51, n. 8, e7129, 2018 .
- SAEED-ZIDANE, M. et al. Cellular and exosome mediated molecular defense mechanism in bovine granulosa cells exposed to oxidative stress. **PlosOne**, v. 12(11), e0187569, 2017.
- SAINI, D.K., SAINI, M.R. Evaluation of radioprotective efficacy and possible mechanism of action of Aloe gel. **Environ Toxicol Pharmacol.** V.31, p.427–435, 2011.
- SANTOS, L.P. et al. Protein localization of epidermal growth factor in sheep ovaries and improvement of follicle survival and antrum formation in vitro. **Reprod Domest Anim.** v.49:783e9, 2014.
- SANTOS, L.P. et al. Protein localization of epidermal growth factor in sheep ovaries and improvement of follicle survival and antrum formation in vitro. **Reprod Domest Anim**, v.49:783e9, 2014.
- SAUMANDE, J. Ovogenèse et folliculogenèse. **Rec. Méd. Vét.** v.157, P. 29-38, 1981.
- SCHWEIZER, U. et al. Selenium and brain function: a poorly recognized liaison. **Brain Research Reviews**, Amsterdam, v. 45, p. 164-178, 2004.
- SHI, L. et al. Long-Term Moderate Oxidative Stress Decreased Ovarian Reproductive Function by Reducing Follicle Quality and Progesterone Production. **PloS one**, 11(9), e0162194, 2016.
- SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biol.** V. 4, p.180-183, 2015.
- SILVA, G. M. et al. Papel dos antioxidantes no cultivo *in vitro* de células ovarianas. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 35, n. 3, p. 315-326, 2011.
- SOUSA, M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 351 -355, 2007.
- SPITSCHAK, M.; HOEFLICH, A. Potential Functions of IGFBP-2 for Ovarian Folliculogenesis and Steroidogenesis. **Frontiers in Endocrinology**, [s.l.], v. 9, p.1-10, 13 abr. 2018.

SURAI, P.F. Selenium in Poultry Nutrition and Health. **Academic Publishers; Wageningen, The Netherlands**, 2018.

SOHEL, M. H. *et al.* Concentration dependent antioxidative and apoptotic effects of sulforaphane on bovine granulosa cells in vitro. **Theriogenology**, v. 97, p. 17-26, 2017.

STIER, A. *et al.* Constraint and cost of oxidative stress on reproduction: correlative evidence in laboratory mice and review of the literature. **Front Zool**. V.9(1), 37, 2012.

SUGINO, N. *et al.* Superoxide dismutase expression in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy. **Mol Hum Reprod**, v.6, p.19-25, 2000.

SUMI, F.A. *et al.* Phenolic Content Analysis of *Aloe vera* Gel and Evaluation of the Effect of Aloe Gel Supplementation on Oxidative Stress and Fibrosis in Isoprenaline-Administered Cardiac Damage in Rats. **Preventive Nutrition and Food Science**, v. 24(3), p. 254-264, 2019.

SUNDE, R. A.; RAINES, A. M. Selenium regulation of the selenoprotein and nonselenoprotein transcriptomes in rodents. **Advances in Nutrition**, v. 2, p.138-150, 2011.

SWARUP, V. *et al.* Antiviral and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid in an experimental murine model of Japanese encephalitis. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 51, p.3367–3370, 2007.

TAMURA, H. *et al.* O estresse oxidativo prejudica a qualidade do oócito e a melatonina protege os oócitos dos danos causados pelos radicais livres e melhora a taxa de fertilização. **Journal of Pineal Research.**, v. 44, p.280-287, 2008.

TANABE, H. *et al.* Melatonin protects the integrity of granulosa cells by reducing oxidative stress in nuclei, mitochondria, and plasma membranes in mice. **J. Reprod. Dev.** v. 61(1), p. 35-41, 2015.

THOMAS, F.H. *et al.* Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term culture. **Reproduction**, v.122, p.487–495, 2001.

TORRAS-CLAVERIA, L. *et al.* Analysis of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry in senescent and water-stressed tobacco. **Plant Science**, v. 182, p. 71-78, 2012.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L.; Microbiologia. 12. Ed. Porto Alegre: **Art-med**, 2012.

TRIPATHI, A. *et al.* Intracellular levels of hydrogen peroxide and nitric oxide in oocytes at various stages of meiotic cell cycle and apoptosis. **Free Radical Research**, v. 43(3), p. 287–294, 2009.

TSICAS, D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: analytical and biological challenges. **Anal Biochem.** v. 524, p. 13-30, 2017.

TU, B.P.; WEISSMAN J.S. Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. **J Cell Biol.** v.164:p.341–346, 2004.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol.** V. 39(1), p. 44 – 84, 2007.

VISTOLI, G. et al. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. **Free Radical Research.** V.47(Supplement 1):3–27, 2013.

WANG, Y. et al. HO-1 reduces heat stress-induced apoptosis in bovine granulosa cells by suppressing oxidative stress. **Aging**, v.11 (15), p. 5535-5547, 2019.

WANG, X.Q. et al. Resveratrol enhances vascular reactivity in mice following lipopolysaccharide challenge via the RhoA ROCK-MLCP pathway. **Exp Ther Med.**v.14, p.308–316, 2017.

WANG, F. et al. Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after in vitro fertilization. **Fertil Steril**, v.101, p.577–586, 2014.

WHITAKER, B. D.; KNIGHT, J. W. Mechanisms of oxidative stress in porcine oocytes and the role of anti-oxidants. *Reproduction, Fertility and Development*, v.20, p. 694-702, 2008.

WINCZURA, A.; ZDZALIK, D.; TUDEK, B. Damage of DNA and proteins by major lipid peroxidation products in genome stability. **Free Radical Research**, v. 46(4), p. 442-459, 2012.

WU, J. et al. T-2 toxin induces apoptosis in ovarian granulosa cells of rats through reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. **Toxicol Lett.**v. 202, p. 168–177, 2011.

XIANG, Y. et al. Alleviation of rosup-induced oxidative stress in porcine granulosa cells by anthocyanins from red-fleshed apples. **PloS One**, v. 12(8), 2017.

XIAO, J. et al. Effects of the insemination of hydrogen peroxide-treated epididymal mouse spermatozoa on γ H2AX repair and embryo development. **PLoS One.** (e38742) 2012.

XU, C., BAILLY-MAITRE B., REED J.C. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. **J Clin Invest.** V.115:2656–2664, 2005.

YAO, X. et al. In vitro influence of selenium on the proliferation of and steroidogenesis in goat luteinized granulosa cells. **Theriogenology**, v. 114, p. 70-80, 2018.

YOSHIHARA, D. et al. Protective role of glutathione S-transferase A4 induced in copper/zinc-superoxide dismutase knockout mice. **Free Radic. Biol. Med.** V. 47, p. 559-567, 2009.

ZHANG, J. Q. et al. Critical Role of FoxO1 in Granulosa Cell Apoptosis Caused by Oxidative Stress and Protective Effects of Grape Seed Procyanidin B2. **Oxid Med Cell Longev.** 6147345, 2016.

7. CAPÍTULO 2

Effect of *Aloe vera* extract on *in vitro* culture of preantral follicles included in bovine ovarian tissue

Effect of *Aloe vera* extract on *in vitro* culture of preantral follicles included in bovine ovarian tissue

Francisco das Chagas Costa^a; Erlândia Márcia Vasconcelos^a; Venância Antônia Nunes Azevedo^a; Ernando Igo Teixeira de Assis^a; Anderson Weiny Barbalho Silva^a; José Roberto Viana Silva^a; Ana Liza Paz Souza Batista^{a*}

^aLaboratório de Biotecnologia e Fisiologia da Reprodução – LABIREP – Universidade Federal do Ceara, Sobral, CE, Brasil

*Endereço para correspondência: ALPS Batista, Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral, Av. Comandante Maurocélvio Rocha Ponte, 100, CEP 62042-280, Sobral, CE, Brasil.

E-mail: *analizabatista@gmail.com*

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of different concentrations of *Aloe vera* extract on cell and tissue morphology, as well as on the activation and development of preantral follicles included in bovine ovarian tissue. Bovine ovaries were collected in a local slaughterhouse, under aseptic conditions. In the laboratory, the ovarian cortex was fragmented and cultured for 6 days in α -MEM + medium alone or supplemented with different concentrations of *Aloe vera* (AV) (1, 5, 10 or 50%). At the end of the culture period, the fragments were submitted to histological processing to evaluate the morphology, activation and follicular development as well as the analysis of the extracellular matrix by staining with red picosirius. Regarding morphology, the results showed that the AV50% treatment had higher rates of normal follicles than the AV10% treatment. Regarding follicular activation and development, there was a decrease in the levels of primordial follicles in the AV10% concentration, which was offset by an increase in the levels of developing follicles in the same treatment. An analysis of the extracellular matrix showed that the AV10% and AV50% treatments maintained collagen levels similar to the fresh control. In conclusion, *Aloe vera*, at a concentration of 10% e 50% allowed follicular activation and development, maintaining normal follicle morphology, in addition to presenting excellent tissue conditions, assuming its antioxidant action.

Key words: *Aloe vera*. Follicle. Bovine. *In vitro* culture

1. INTRODUCTION

In vitro culture is a biotechnology that has been extensively studied, given the possibility of using the thousands of potentially useful preantral follicles that make up the ovary of domestic mammals (FIGUEIREDO et al., 2018; ARAÚJO et al., 2014). In species such as goats (MAGALHÃES et al., 2011) and sheep (ARUNAKUMARI; SHANMUGASUNDARAM; RAO, 2010) the production of embryos has been reported, other species however, such as cattle, the results have been limited to the formation of early antral follicles (MCLAUGHLIN et al., 2010). In fact, the *in vitro* development of these follicles to produce fully grown and competent oocytes has been a great challenge (MBEMYA et al., 2018), which makes their improvement essential, allowing the use of the oocytes included in these follicles in reproduction techniques assisted (PAULINO et al., 2020), in addition to contributing to the elucidation of the mechanisms underlying the dynamics of follicular development *in vivo*, still little known.

Among the variables that can affect the result of follicular culture *in vitro*, there is the production of oxidizing compounds that can be greater than their elimination by natural antioxidant defense systems, which causes metabolic imbalance that can cause several damages to the cell and the tissue (STIER et al., 2012; MORAIS et al., 2019), reducing the quality of oocytes and embryos produced (LINS et al., 2017). For this reason, the use of antioxidants in the culture medium can result in beneficial effects, reducing the harmful consequences caused by excessive levels of reactive oxygen species.

In this sense, aiming at improving cultivation techniques, several components extracted from plants, especially those with antioxidant capacity, have gained significant relevance for their potential in combating reactive oxygen species during *in vitro* cultivation of ovarian follicles, such as rutin (LINS et al., 2017); resveratrol (ROCHA et al., 2018); extract of *Amburana cearensis* (GOUVEIA et al., 2016) and the extract of *Justicia insularis* (MBEMYA et al., 2018) which were responsible for maintaining the balance between the production of reactive oxygen species and the antioxidant defense systems favoring, thus, the maintenance of acceptable rates of viable follicles and oocytes. Plant extracts such as *Aloe vera* (AV) have also gained prominence as attenuators of oxidative stress. According to Sumi et al. (2019), the vast composition causes the plant to present several pharmacological properties, including antioxidant activity. The modulating activity of oxidative stress has been attributed to the presence in the plant gel of substantial amounts of antioxidant compounds, including α -tocopherol (vitamin E), carotenoids, ascorbic acid (vitamin C), flavonoids and tan-

nins (CESAR et al., 2018). In a recent study, the beneficial effect of AV on oxidative stress parameters in rats was demonstrated, with the extract responsible for increasing the activity of important antioxidant enzymes such as CAT and SOD, in addition to the increase in GSH in plasma and tissues (SUMI et al ., 2019). Also in rats, AV was responsible for better histological characteristics in testicles (SHAHRAKI et al., 2014). Although AV has shown antioxidant action in several cells and tissues, until now, the effects of the plant extract as a supplement of culture media for preantral ovarian follicles included in ovarian tissue are still unknown.

According to studies on the plant, it is believed that the use of *Aloe vera* extract in the *in vitro* cultivation of ovarian tissue would allow a greater follicular development with maintenance of the morphological integrity of the tissue and the follicle. Then, considering the results already reported with the use of the plant, the present study aimed to evaluate the effect of adding AV extract as a supplement in the *in vitro* culture medium of bovine ovarian tissue on the cell and tissue morphology; activation and development in a 6 day culture.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Chemicals

Unless otherwise indicated, culture media and other chemicals used in this study purchased by Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA).

2.2 Ovarian collection

Bovine ovaries (n = 20) of cows without defined age or breed and in unidentified stages of the estrous cycle were collected at a local slaughterhouse. Immediately after death, each pair of ovaries was washed in ethanol (70%) for approximately 10 s, followed by two more washes in 0.9% saline solution, at 4°C, supplemented with penicillin (100 µg / ml) and streptomycin (100 µg / ml). After washing, each pair of ovaries was individually transported to the laboratory in falcon tubes containing α -MEM supplemented with penicillin (100 µg / ml) and streptomycin (100 µg / ml) within 1 hour. This study was approved and carried out in accordance with the rules and guidelines of the Ethics and Animal Welfare Committee of the Federal University of Ceará

2.3 *Aloe vera* extract isolation

The *Aloe vera* extract used in the study was obtained from the leaves of the plant. For this, the *Aloe vera* plant was grown in a region with coordinates 3°45'49.3"S, 40°50'14.0"W, with temperatures ranging from 24° to 36°C, semi-arid tropical climate. For obtaining the extract, leaves at an intermediate stage of maturation were collected from plants using slides that were properly sanitized and later transported to the laboratory. In the laboratory, the leaves were washed with distilled water and had their surface part removed to expose the liquid and crystalline gel. After that, using gentle spoon movements, the gel was passed through a sieve and collected in a beaker until sufficient quantity was obtained, then transferred to a sterile 50 ml falcon tube and stored at 4°C until use. Before supplementation of the base medium, the extract was filtered, using filters with 45µm pores.

2.4 Tissue preparation and *in vitro* culture

In laboratory, under sterile conditions, using scalpels n. 22, the cortex of each pair of ovaries (n = 10 pairs) was dissected from the medullary tissue and cut into 22 fragments of approximately 3x3x1 mm in dissection medium composed of α -MEM supplemented with penicillin (100µg / ml) and streptomycin (100 µg / ml). For *in vivo* control, 2 fragments taken at random were immediately fixed in paraformaldehyde (4%) for 24 hours at 4°C for histological analysis in morphology and follicular growth were observed as well as for analysis of the extracellular matrix (MEC). The remaining fragments were cultured for six days in 24-well plates (TPP 92024), containing 1 ml of culture medium. The control medium, identified with α -MEM +, consisted of α -MEM (pH 7.2 - 7.4) supplemented with BSA (1.25 mg / ml) glutamine (2mM), hypoxanthine (2mM), penicillin / streptomycin (100µg / ml), ascorbic acid (50µg / ml), insulin (10µg / ml), transferrin (5.5µg / ml), selenium (10µg / ml). The fragments were randomly distributed and cultured in α -MEM + alone or supplemented with 1%, 5%, 10% or 50% extract *Aloe vera*. Cultivation conditions were at 38.5°C with 5% CO₂. The culture medium was stabilized at 38.5°C for 4 hours before use and, every 2 days of cultivation, 60% of the medium in each well was replaced with fresh medium. After the end of the culture period in each treatment, the fragments were sent to the same evaluations performed for the *in vivo* control.

2.5 Morphological analyses and assessment of *in vitro* follicular growth

Fresh control (D0) and cultured fragments, after fixation in paraformaldehyde (4%) for 24 hours, were dehydrated in increasing concentrations of ethanol, cleared using xylol and included in histological paraffin and sectioned in series with a thickness of 6 μm . At each 5th section, slides were mounted which were stained with hematoxylin and eosin. Only preantral follicles whose oocytes presented the nucleus evident in the section observed were analyzed to avoid double counting. For all analyzes, the examiner was blinded to the treatment groups. The analysis of the follicles in the tissue fragments was performed in all sections under an optical microscope (Nikon, Eclipse, TS 100, Japan) under 400x magnification. The classification of healthy follicles was based on the same criteria as Telfer et al. (2008) with changes. For the follicles to be categorized as morphologically normal, the oocyte had to be roughly circular surrounded by a pellucid zone, absence of pycnotic bodies and cytoplasmic retraction. In addition, the degree of organization of the surrounding granulosa cells was considered. Degenerate follicles were defined as those with a retracted oocyte, presence of a pycnotic nucleus and/or was surrounded by disorganized granulosa cells, detached from the basement membrane (CAVALCANTE et al., 2019).

The stage of follicular development was categorized based on Figueiredo et al. (2008). The follicles were classified as primordial (oocyte surrounded by one layer of flattened granulosa cells), primary (oocyte surrounded by one layer of cubic granule cells) and secondary (oocytes surrounded by two or more complete layers of cells from the cubic granulosa). The proportion of follicles at different stages of development was defined as a percentage of morphologically healthy follicles over the total follicle count.

2.6 Analysis of the extracellular matrix

In order to evaluate the collagen fibers of the extracellular matrix of the ovarian cortex, staining with Picrosirius Red (Abcam Kit) was performed following the methodology described by Rittié (2017) with modifications. Briefly, 6 μm ovarian sections were dewaxed in xylol and incubated in Sirius Red solution (0.1%) for 1 hour at room temperature. Then, the excess dye was removed with acetic acid solution (0.5%) and the sections were then dehydrated and subjected to slide assembly with subsequent observation under an optical microscope (Nikon, Eclipse, TS 100, Japan) under 400x magnification. For each treatment, the percentage of the area occupied by collagen fibers in ten different fields was measured with the aid of a DS Cooled Camera Head DS-Ri1 coupled to a Nikon, Eclipse, TS 100, Japan) microscope and the images were analyzed by Image J Software (Version 1.51p, 2017) with 400x

magnification. Only the collagen fibers were marked in red with the picrosirius stain, while the follicles remained uncolored (white). The analyzer software automatically excluded the circumference of the unstained follicles from the total area marked in red.

2.7 Statistical analysis

The statistical analysis was performed using the computer program GraphPad Prisma (5.0). Data that did not show a normal distribution, selected by the Shapiro-Wilk test, underwent logarithmic transformation. The parametric variables of the average percentage of normal follicles and follicular activation in each treatment were evaluated by the Tukey test and the comparison between treatments using the Kruskal-Wallis. For an analysis of collagen fibers, data were analyzed by the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's comparison. The differences were statistically significant when $p < 0.05$.

3. RESULTS

3.1 Analysis of follicle distribution in fresh control

From each pair of ovaries collected for *in situ* culture, two fragments were sent to the fresh control group, comprising 20 fragments, with a total of 213 follicles analyzed. Of the 98% of morphologically normal follicles present in this group, the highest prevalence observed was of primordial follicles (56.08%), followed by primary (30.51%) and secondary follicles (13.41%). In addition, no antral follicle was observed in these fragments.

3.2 Effect of *Aloe vera* on follicular morphology after *in vitro* culture

Of the fragments intended for culture, 932 follicles were analyzed. The plank of histologic images (Figure 1) presents normal and degenerate follicles found in uncultured and cultured ovarian cortical fragments. Morphologically normal follicles in the different categories presented oocyte with central nucleus and granulosa cells intact and organized, while degenerated follicles showed nuclear pycnosis and/or cytoplasmic retraction or disorganization of the granulosa cells.

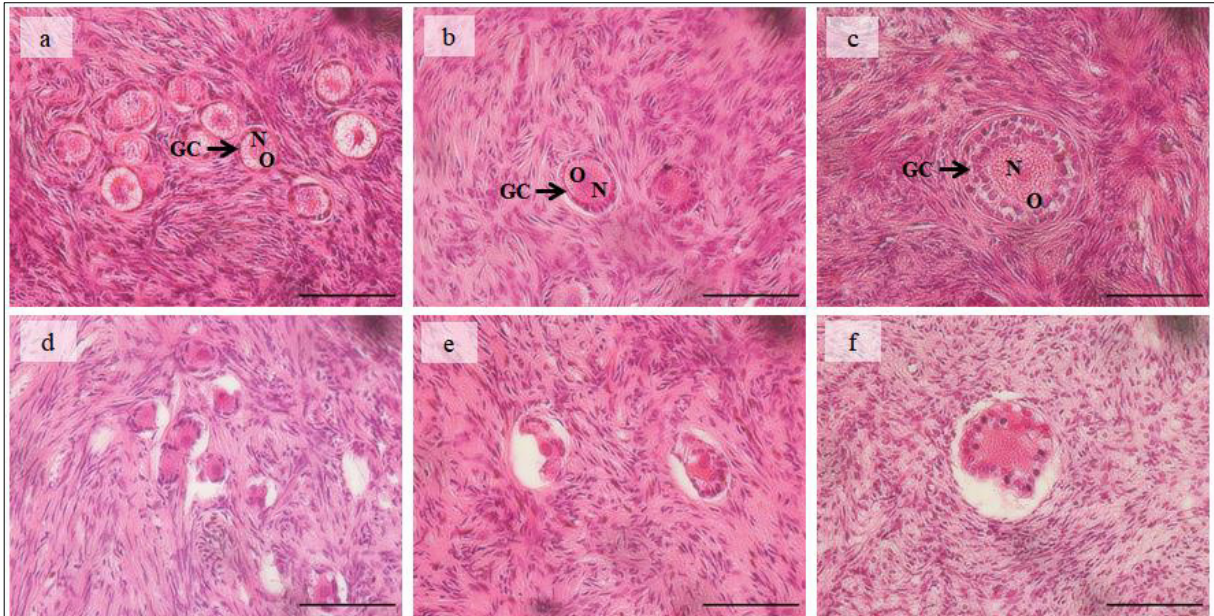


Figure 1. Representative images of sections of bovine ovarian tissue showing morphologically normal (a-c) and degenerate (d-f) follicles from different categories stained with hematoxylin and eosin. Normal primordial follicles (a) and degenerate (d); normal (b) and degenerate (e) primary; normal (c) and secondary degenerate (f). Granulosa cells (GC); oocyte (O); oocyte nucleus (N). Scale bar: 100 μ m.

After a 6-day culture period, there was a significant decrease in the proportion of normal follicles in all groups tested, compared to the fresh control group ($P < 0.05$). Among the treatments, the MEM, AV1% and AV5% groups do not differ between themselves in relation to AV10% and AV 50% groups. However, it was observed that treatment with AV50% shows higher rates of morphologically normal follicles than the group with AV10% ($P < 0.05$) (Figure 2).

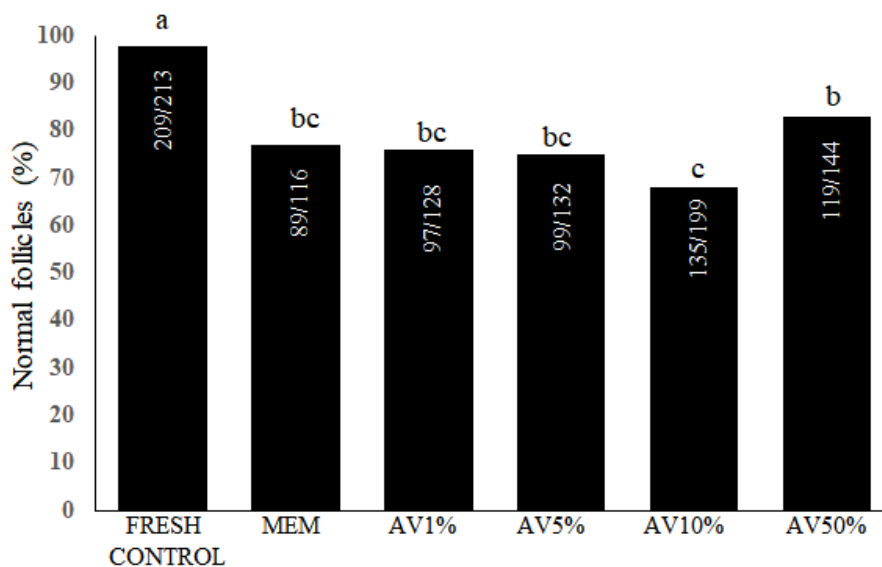


Figure 2. Percentages (mean \pm SE) of morphologically healthy follicles in the fresh control (uncultivated tissue) and in the different treatment groups at the end of 6 days of culture with different concentrations of *Aloe vera*: MEM (cultivated tissue without *Aloe vera*); AV1%, AV5%, AV 10% and AV50% (cultivated tissue in the presence of 1%, 5%, 10% or 50%, respectively, of *Aloe vera*). a, b, c Different lowercase letters indicate statistically significant differences between treatments ($P < 0.05$).

3.3 Effect of *Aloe vera* on the activation and development of primordial follicles

After analysis, a significant decrease in the number of primordial follicles was observed in the MEM and AV10% groups compared to the fresh control and AV1% groups (Figure 3). This decline was offset by a significant increase in the percentage of developing follicles (primary and secondary follicles) in the same groups (MEM and AV10%) ($p < 0.05$) (Figure 4). The treatments AV1, AV5 and AV50%, did not differ from each other neither in the rate of primordial follicles nor in activation (Figures 3 and 4) ($p < 0.05$).

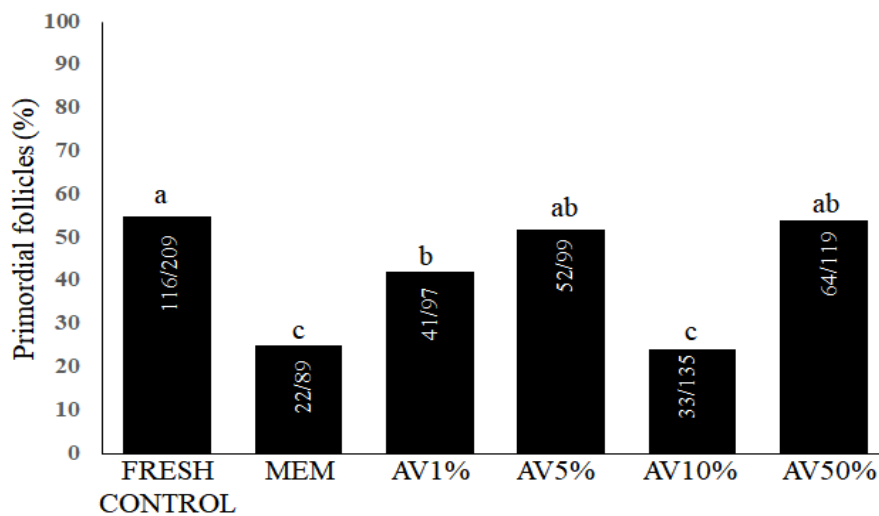


Figure 3. Percentages (mean \pm SE) of primordial follicles in the fresh control (uncultivated tissue) and in the different treatment groups at the end of 6 days of culture with different concentrations of *Aloe vera*: MEM (cultivated tissue without *Aloe vera*); AV1%, AV5%, AV 10% and AV50% (cultivated tissue in the presence of 1%, 5%, 10% or 50%, respectively, of *Aloe vera*). a, b, c Different lowercase letters indicate statistically significant differences between treatments ($p < 0.05$).

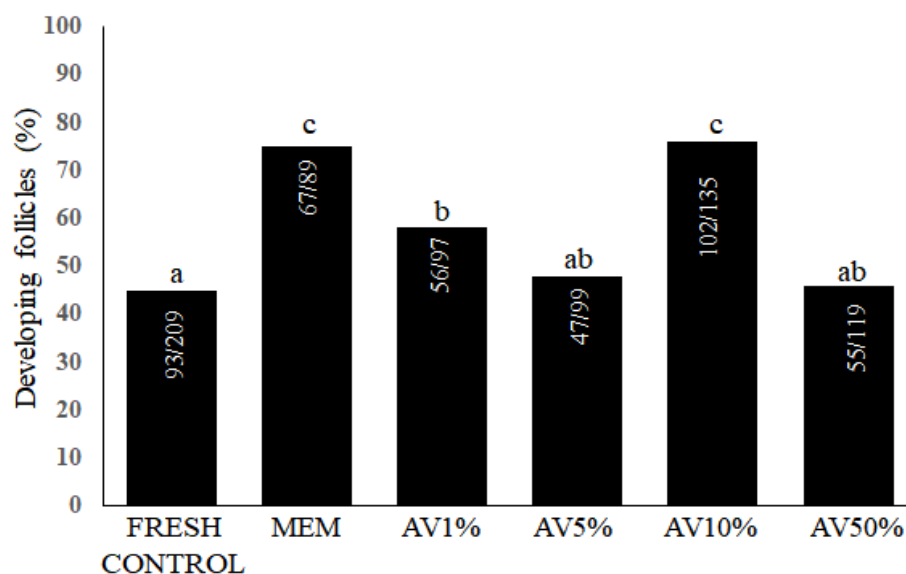


Figure 4. Percentages (mean \pm SE) of developing follicles in the fresh control (uncultivated tissue) and in the different treatment groups at the end of 6 days of culture with different concentrations of *Aloe vera*: MEM (cultivated tissue without *Aloe vera*); AV1%, AV5%, AV 10% and AV50% (cultivated tissue in the presence of 1%, 5%, 10% or 50%, respectively, of *Aloe vera*). a, b, c Different lowercase letters indicate statistically significant differences between treatments ($p < 0.05$).

3.4 Assessment of ovarian extracellular matrix

The extracellular matrix, evaluated by staining with picrosirius red, after cultivation, demonstrated that the AV 10% and AV 50% treatments provided a higher percentage of collagen fibers similar to the fresh control ($p < 0.05$). When comparing the other treatments with each other, no statistical differences were observed between them (Figures 5) ($p < 0.05$). Under evaluation of the histological plaque, it is possible to check the collagen regions, with higher density in treatments AV10 and AV50% (Figures 6e and 6f).

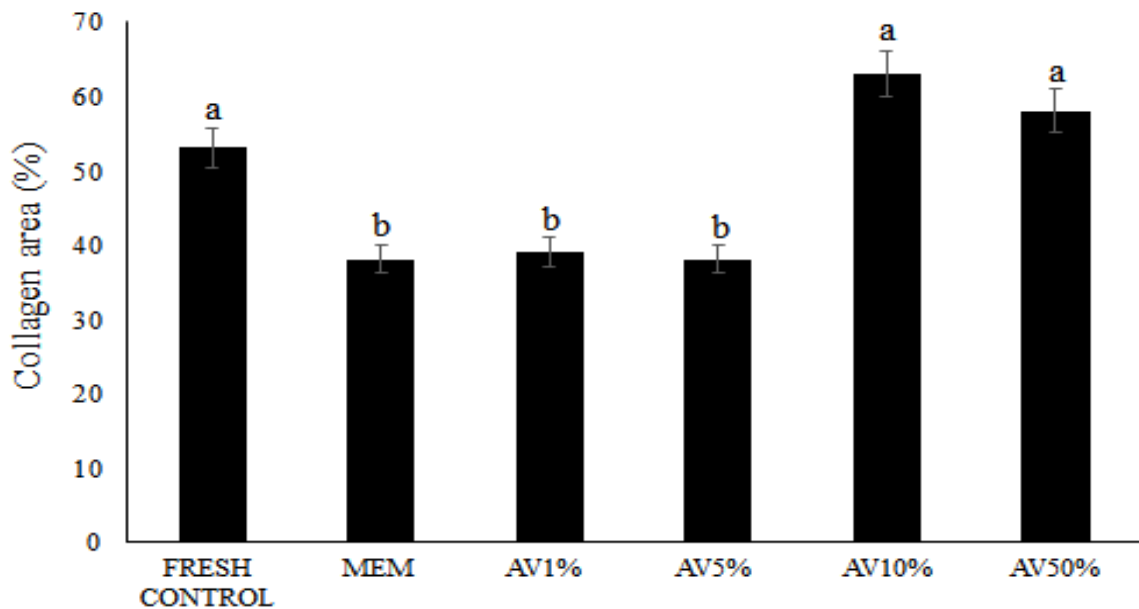


Figure 5. Collagen levels (mean \pm SD) in the ovarian tissue analyzed by the picrosirius red and observed under optical microscopy (400x) in the fresh control (uncultivated tissue) and in the different treatment groups at the end of 6 days of culture with different concentrations of *Aloe vera*: MEM (cultivated tissue without *Aloe vera*); AV1%, AV5%, AV 10% and AV50% (cultivated tissue in the presence of 1%, 5%, 10% or 50%, respectively, of *Aloe vera*). a, b, c Different lowercase letters indicate statistically significant differences between treatments ($p < 0.05$).

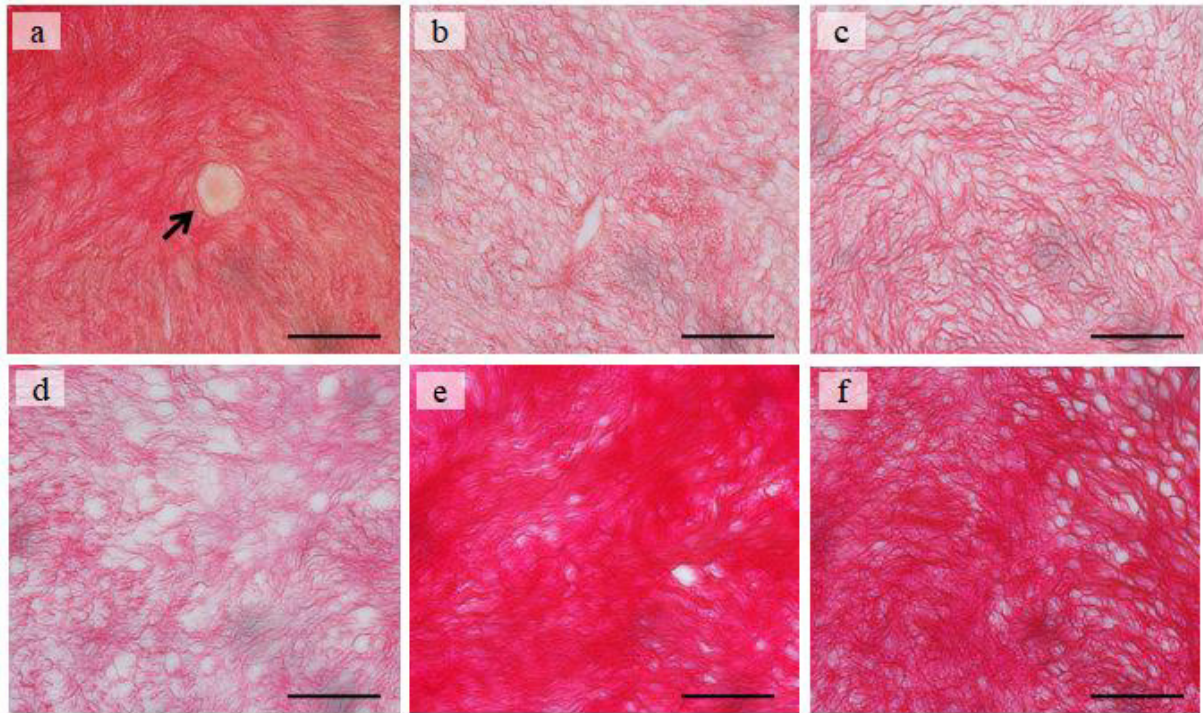


Figure 6. Representative images of collagen fibers labeled by a red picrosirius stain and observed under optical microscopy (400x). Fresh control; MEM (b); AV1% (c); AV5% (d); AV10% (e); AV50% (f). The black arrow shows an uncolored follicular area. Scale bar: 100 μ m.

4. DISCUSSION

The present study investigated for the first time the effect of *Aloe vera* extract on the *in vitro* culture of preantral ovarian follicles, including bovine ovarian tissue. The greater presence of primary follicles observed in the present study is in agreement with the literature, which describes that, in mammals such as cattle, the ovaries contain a large reserve of primordial follicles, which are cyclically stimulated to undergo a sequential growth program (LIMA -VERDE et al., 2011). In recent investigations conducted by Maidarti et al. (2019); Cunha et al. (2017); Passos et al. (2016), also with bovine ovarian tissue, an analysis of follicular distribution in fresh control also revealed higher proportions of primordial follicles followed by growing follicles.

It was observed that the presence of *Aloe vera* extract maintained significant levels of morphologically healthy follicles. It is believed that this fact is due to the cellular and tissue redox balance, which is responsible for maintaining the normal cell morphology and viability of ovarian follicles under *in vitro* culture. Since high levels of reactive oxygen species (ROS) can activate apoptotic cascades that would result in atresia and degeneration of follicles (CINDROVA-DAVIS et al., 2007; AGARWAL et al., 2012). In this sense, the protective effect of *Aloe vera* in situations of oxidative stress has been widely reported in the

literature. The amounts of main antioxidants present in *Aloe vera* leaves were evaluated in a study by Cesar et al. (2018) that demonstrated the significant presence of ascorbic acid, carotenoids and soluble polyphenols. In that same report it was demonstrated that the presence of *Aloe vera* at a concentration of 10% increased the growth of HeLa cells in culture and reduced the cytotoxicity induced by H₂O₂. In male gametes Behmanesh et al. (2018) and Bala et al., (2016) demonstrated that *Aloe vera* was able to protect reproductive cells against the oxidative damage induced by Bisphenol A (BPA) and X-rays, respectively. In addition, it has been shown that *Aloe vera* can reduce extensive damage to membrane lipids, thus reducing apoptotic processes (HARITHA; RAMESH; SARALAKUMARI, 2014). This reduction in apoptosis rates by *Aloe vera* has also been reported by Bala et al. (2018) in liver and kidney tissue subjected to oxidative stress induced by X-rays, where it was observed that the DNA appeared undamaged after pretreatment with *Aloe vera*.

The presence of 10% *Aloe vera* extract reduced the proportion of primordial follicles and increased levels of developing follicles when compared to the control group, demonstrating that there was follicular activation, although these results did not differ from the group MEM. It is known, however, that the activation of primordial follicles is a very dynamic and tightly controlled process and, despite the enormous progress made, many molecular mechanisms are still not fully understood (SÁNCHEZ; SMITZ, 2012). However, recent studies indicate that primordial follicles can be spontaneously activated as a result of the interruption of the Hippo signaling pathway during the preparation of ovarian tissue (KAWAMURA et al., 2013; HSUEH et al., 2015). In fact, it has been reported that the mechanical manipulation of ovarian tissue by cutting it into fragments alters the intercellular tension and facilitates the conversion of globular actin into fibrous actin, which interrupts the Hippo pathway (CHENG et al., 2015) and leads to increased expression of downstream growth factors such as connective tissue growth factor (CTGF or CCN2) (KAWAMURA et al., 2013). Studies by Hsueh et al. (2015) showed that the secretion of this factor was able to promote the growth of primordial follicles *in vitro*. In addition, using a murine model, the promotion of follicular growth after ovarian fragmentation has already been demonstrated, which decreased the levels of phospho-YAP (pYAP) and increased the nuclear localization of YAP and the expression of CCN growth factors and apoptosis inhibitors. BIRC (LIU-CHITTENDEN et al., 2012).

Regarding the evaluation of the extracellular matrix, it was observed that the presence of *Aloe vera* in concentrations of 10% and 50% maintained levels of collagen in the extracellular matrix (MEC) similar to the *in vivo* control. The significance of these findings is justified by the importance that MEC has for the survival of follicular structures and for the

female gamete. In fact, the tissue matrix plays an important role in cell-cell and cell-tissue interactions, thus directing cell fate and influencing tissue development and homeostasis (MUNCIE; WEAVER, 2019). The maintenance of tissue homeostasis is strongly influenced by a large family of matrix metalloproteinases (MMPs) responsible for tissue remodeling and degradation of MEC components, including collagens (VERMA, et al., 2007). Although MMPs are strictly regulated at the level of transcription, a variety of stresses, including oxidative stress, can result in excessive degradation of the MEC (QUAN et al., 2013). From these studies, and based on the observed results, we can see that the low concentrations of AV (1 and 5%) were insufficient to combat the oxidative stress caused by the culture process. It is also worth noting that, although the MEM treatment, caused follicular activation, the demonstration of the low density of collagen fibers in comparison to treatments with AV (10 and 50%), raises the hypothesis that the lower cell-tissue interaction may harm further developments. Saito et al. (2016) had already studied the protective effect of *Aloe vera* on MEC in the skin of mice irradiated by X-rays. It was observed that treatment with *Aloe vera* significantly prevented the increase in total protein expression of MMP-2 and MMP-9. A similar effect was reported by Chul-Hong et al. (2017). In that study, the authors demonstrated that *Aloe vera* was able to suppress tissue levels of mRNA for MMP-9 as well as levels of the enzyme itself in mouse models while maintaining tissue structure within acceptable parameters.

In view of the analyzes carried out in the present study, it is concluded that *Aloe vera*, at a concentration of 10% and 50% allowed follicular activation and development, maintaining the normal follicle morphology in addition to presenting excellent tissue conditions, assuming antioxidant action.

Acknowledgments

This research was supported by the Cearense Foundation for Support for Scientific and Technological Development (Funcap).

REFERENCES

- AGARWAL, A. et al. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. **Reprod. Biol. Endocrinol.** V.10(49), 2012.
- ARAÚJO, R.A. et al. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, V. 12, 2014.
- ARUNAKUMARI, G.; SHANMUGASUNDARAM, N.; RAO, V.H. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. **Theriogenology**, v. 74(5), p. 884-894, 2010.
- BALA, S. et al. Protective role of Aloe vera against X-ray induced testicular dysfunction. **Andrologia**, v. 49(7), p. 1-16, 2016.
- BEHMANESH, M.A. et al. Protective effect of *Aloe vera* extract against bisphenol A induced testicular toxicity in wistar rats. **Cell Journal (Yakhteh)**, V. 20(2), p.278-283, 2018
- CESAR, V. et al. Cell-Type-Specific Modulation of Hydrogen Peroxide Cytotoxicity and 4-Hydroxynonenal Binding to Human Cellular Proteins In Vitro by Antioxidant Aloe vera Extract. **Antioxidants**, v. 7(10), 2018.
- CUNHA, E.V. et al., Effects of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) on in vitro development and survival of bovine preantral follicles enclosed in fragments ovarian tissue. **Zygote**, v.25(3), p. 256-264, 2017.
- FIGUEIREDO, J.R; LIMA, L.F. Tecnologia do ovário artificial: aplicações, estado da arte, limitações e perspectivas. **Rev Bras Reprod Anim**, v.41, n.1, p.248-253 2017.
- FIGUEIREDO, J.R. et al. Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais – MOIFOPA. In: GONÇALVES, P.B.D., FIGUEIREDO, J.R., FREITAS, V.J.F. (Eds). Biotécnicas Aplicadas à Reprodução **Animal. Editora Roca**, São Paulo, p.303-327, 2008.
- GOUVEIA, B. B. et al. Supplemented base medium containing *Amburana cearensis* associated with FSH improves in vitro development of isolated goat preantral follicles. **Theriogenology**, v. 86, p. 1275–1284, 2016.
- HSUEH, A.J.W. et al. Intraovarian control of early folliculogenesis. **Endocr. Rev.** v.36, p.1–24, 2015.
- KAWAMURA, K. et al. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. **Proc. Natl. Acad. Sci.** V.43, p.17474–9, 2013.
- LIMA-VERDE, I. B.; ROSSETTO, R.; FIGUEIREDO, J. R. Influência dos hormônios esteroides na foliculogênese. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.35, n.4, p.472-482, out/dez. 2011.

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

MAGALHÃES, D.M. et al. Effect of the medium replacement interval on the viability, growth and *in vitro* maturation of isolated caprine and ovine pre-antral follicles. **Reprod Domest Anim.**, v.46, p.134–140, 2011.

MAIDARTI, M. et al. Inhibition of PTEN activates bovine non-growing follicles in vitro but increases DNA damage and reduces DNA repair response. **Human Reproduction**, V. 34(2), p. 297-307, 2019.

MBEMYA, G.T. et al. Supplementation of in vitro culture medium with FSH to grow follicles and mature oocytes can be replaced by extracts of *Justicia insularis*. **Plos One**, v.13 (12): e0208760, 2018.

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

MUNCIE, J.M. et al., Patterning the Geometry of Human Embryonic Stem Cell Colonies on Compliant Substrates to Control Tissue-Level Mechanics. **J. Vis. Exp.**, V. 28, 2019.

PASSOS, J.R. et al. Protein and messenger RNA expression of interleukin 1 system members in bovine ovarian follicles and effects of interleukin 1 β on primordial follicle activation and survival in vitro. **Domestic Animals Endocrinology**, v. 54, p. 48-59, 2016.

PAULINO, L.R.F.M. et al. Effects of epidermal growth factor and progesterone on development, ultrastructure and gene expression of bovine secondary follicles cultured in vitro. **Theriogenology**, v.142, p. 284-290, 2020.

QUAN, J. et al. Transforming growth factor- β 1 treatment of oral cancer induces epithelial-mesenchymal transition and promotes bone invasion via enhanced activity of osteoclasts. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 30(5), p. 659-670, 2013.

RITTIÉ, L. Method for Picrosirius Red-Polarization Detection of Collagen Fibers in Tissue Sections. **Methods Mol. Biol.** V. 1627, p. 395-407, 2017.

ROCHA, C.D. et al. Positive effect of resveratrol against preantral follicles degeneration after ovarian tissue vitrification. **Theriogenology**, V.114, p. 244-251, 2018.

SAITO, M. et al. Oral administration of Aloe vera gel powder prevents UVB-induced decrease in skin elasticity via suppression of overexpression of MMPs in hairless mice. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, V. 80(7), P. 1416-1424, 2016.

SHAHRAKI A.; SHAHKARI MOJAHED A.; AFSHAR-GOLI J. The effects of hydroalcoholic extract of Aloe vera gel on spermatogenesis of adult male rats. **Int J Biosci**, v.5(7), p. 158-165, 2014.

STIER, A. et al. Constraint and cost of oxidative stress on reproduction: correlative evidence in laboratory mice and review of the literature. **Front Zool.** V.9(1), 37, 2012.

SUMI, F.A. et al. Phenolic content analysis of *aloe vera* gel and evaluation of the effect of aloe gel supplementation on oxidative stress and fibrosis in isoprenaline-administered cardiac damage in rats. **Preventive Nutrition and Food Science**, V. 24(3), p. 254-264, 2019.

TELFER, E.E. et al. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. **Hum Reprod.** V.23, p. 1151-1158, 2008.

VERMA, R.P. et al. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. **Bioorg. Med. Chem.** V.15, p. 2223-2268, 2007.

8. CAPÍTULO 3

Effect of *Aloe vera* on cryopreservation of preantral follicles included in bovine ovarian tissue

Effect of *Aloe vera* on cryopreservation of preantral follicles included in bovine ovarian tissue

Francisco das Chagas Costa^a; Erlândia Márcia Vasconcelos^a; Lais Raiane Feitosa Melo Paulino^a, Venância Antônia Nunes Azevedo, José Roberto Viana Silva^a; Anderson Weiny Barbalho Silva^a, Ana Liza Paz Souza Batista^{a*}

Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia da Reprodução – LABIREP – Núcleo de Biotecnologia de Sobral – NUBIS - Universidade Federal do Ceara, Sobral, CE, Brasil

*Endereço para correspondência: ALPS Batista, Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral, Av. Comandante Maurocélvio Rocha Ponte, 100, CEP 62042-280, Sobral, CE, Brasil.

E-mail: analizabatista@gmail.com

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of adding *Aloe vera* to the vitrification solution of bovine ovarian tissue on morphological parameters, viability, activation and follicular development as well as on mRNA expression for *CAT*, *SOD*, *PRDX6* and *GPX1*. Bovine ovaries were collected in a local slaughterhouse, under aseptic conditions. In the laboratory, the ovarian cortex was fragmented and the fragments were vitrified in a vitrification solution alone or added with two concentrations of *Aloe vera* (10 and 50%). After heating, the fragments were submitted to morphological and viability evaluation as well as analysis of gene expression by rtPCR. The results showed that, after vitrification, the follicles were viable in all treatments and better rates of secondary follicles were observed in the concentration of 10% of *Aloe vera*. In addition, the presence of *Aloe vera* in the vitrification solution maintained significant levels of collagen in the tissue matrix and increased expression of mRNA for *SOD*, *PRDX6* and *GPX1*, in addition to promoting follicular activation and development in tissue grown after vitrification. In conclusion, *Aloe vera* in the vitrification solution improved the overall quality of the follicle and ovarian tissue, restoring development after vitrification. In addition, the marked expression of genes involved in oxidative stress, suggests the potential antioxidant effect of the plant extract.

Keywords: Bovine. Ovarian tissue. Vitrification. *Aloe vera*. Oxidative stress

1. INTRODUCTION

Vitrification is a method of cryopreservation that has been applied to ovarian tissues to preserve fertility (JENSEN et al., 2016; SILBER, 2016), which has presented advantages in relation to slow freezing, since it allows the rapid cooling of ovarian tissues without the need for specific equipment, such as a controlled-rate freezer (SHI et al., 2017). In addition, the sudden reduction in temperature used in vitrification protocols attenuates the formation of ice crystals inside the cells, given that there is not enough time or energy for molecular rearrangement of water and, thus, the natural disturbance of liquid molecules in the tissue is maintained, attenuating any disturbance in the system (LEONEL et al., 2019). According to Fabbri et. (2014), vitrification protocols maintain tissue quality, with a lower incidence of apoptosis. Authors also reveal that vitrification maintains the expression of extracellular matrix proteins such as cadherin, preventing osmotic lesions (OHKAWARA, et al., 2018; TOYAMA-MORI et al., 2019).

In terms of practical applicability, for domestic species, long-term storage of ovarian tissues is a conducive approach to the genetic conservation of females of endangered species and valuable animals (BECK et al., 2020) insofar as it becomes possible to conserve pre-antral follicles and improve the use of female genetic material (FIGUEIREDO et al., 2009). In fact, unlike fully developed pre-ovulatory oocytes, the oocytes contained in the primordial and pre-antral follicles present in greater amounts in the ovarian cortex are more suitable for cryopreservation due to their smaller size, absence of the pellucid zone, in addition to metabolic quiescence. In addition, oocytes from these follicles have the ability to repair sub-lethal damage resulting from cryopreservation procedures, due to the long growth phase during development following cryopreservation (SHAW et al., 2000). In humans, conservation of ovarian tissue followed by autotransplantation has been used to preserve fertility in cancer patients (LOCATELLI et al., 2019) and in prepubertal girls or women with sensitive hormonal neoplasms (DE VOS et al., 2014). In addition, this biotechnology has the potential to restore the endocrine and reproductive function of the ovary (MASSIGNAM et al., 2018). Therefore, the cryopreservation of tissue fragments appears to be a generally more acceptable procedure for preserving fertility, and for this reason, safe protocols are necessary to guarantee the viability of the procedure (MASSIGNAM et al., 2018).

In this context, despite the expressiveness of studies in this field, cryopreservation protocols still need further refinements (LEN et al., 2019). It is known that during the vitrification procedure, reactive oxygen species (EROS) can be generated by different mechanisms,

such as increased oxidative metabolism, osmotic stress, or even by changes in cellular defense mechanisms (GUPTA et al., 2010; MARTINO et al., 2013). As a result, the imbalance between the production of EROS and cellular antioxidant defenses can cause damage to the structure of the cytoskeleton, membrane lipids, proteins and DNA (CASTILLO-MARTÍN et al., 2014; DEHGHANI-MOHAMMADABADI et al., 2014). In addition, the extracellular matrix can also be affected by the accumulation of EROS in the tissue (KAMMERYER; LUITEN, 2014). Reactive species can trigger unregulated expression of metalloproteinases (MMPs), which are an important family of enzymes responsible for cleaving components of the extracellular matrix (MEC) such as collagen, fibronectin and laminin (PROVENZANO et al., 2020). In addition, matrix degradation can also occur due to the gradual damage to DNA bases in the genes that encode components of this structure (KAMMERYER; LUITEN, 2014). Together, these effects dictate subsequent cellular results, such as cell senescence, apoptosis and altered cell signaling, which compromises the viability of cryopreserved tissue (LEN et al., 2019).

In this sense, studies have been carried out with the objective of minimizing cell damage induced by cryopreservation (ROCHA et al., 2017). Among the strategies, the addition of natural antioxidant compounds to the vitrification solution has been evaluated (HARA et al., 2018). For this purpose, *Aloe vera* extract is an excellent alternative. Although the numerous activities and underlying molecular mechanisms of *Aloe vera* fractions and components are not yet fully documented (CHUL-HONG et al., 2017), its solid content is known to contain more than 75 different potentially active compounds, including minerals, enzymes, water- and fat-soluble vitamins, simple and complex polysaccharides, as well as phenolic compounds and organic acids, causing the plant to have several pharmacological properties, including antioxidant activity (SUMI et al., 2019; DAS et al., 2011). This oxidative stress modulating activity has been attributed to the presence in the plant gel of substantial amounts of antioxidant compounds, including α -tocopherol (vitamin E), carotenoids, ascorbic acid (vitamin C), flavonoids and tannins, with in vitro studies that demonstrate the potential for eliminating various free radicals by the *Aloe vera* gel (CESAR et al., 2018).

In fact, a recent study conducted by Sumi et al. (2019) demonstrated the beneficial effect of *Aloe vera* on oxidative stress parameter in rats. In this investigation, *Aloe vera* was able to increase the activity of important antioxidant enzymes such as CAT and SOD, in addition to increasing GSH in the tissue. Concomitant to these results, a significant decrease in malondialdehyde (MDA) was also observed. It has also been verified that the plant extract is capable of eliminating the free radicals 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazil (DPPH), 2,2-azinobis-

(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) and nitric oxide in a concentration-dependent manner (SAINI, SAINI, 2011). In addition, *Aloe vera* has already shown protective activity of MEC by reducing the levels of metalloproteinases-9 (MMP-9) in a rat model (CHUL-HONG et al., 2017).

However, until now, the effects of adding *Aloe vera* extract to a vitrification solution of ovarian tissue in the bovine species are still unknown. So, considering the results already reported in previous investigations in other species, the present study aimed to evaluate the effect of adding *Aloe vera* extract as a supplement in the vitrification medium of bovine ovarian tissue on morphological parameters, of follicular viability, activation, evaluation extracellular matrix, mRNA expression for antioxidant enzymes (SOD, CAT, PRDX1 and GPX6) after vitrification.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Chemicals

Unless otherwise indicated, culture media and other chemicals used in this study purchased by Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA).

2.2 Ovarian collection

For the study, twenty pairs of ovaries of pluriparous cows, of mixed breed, from local slaughterhouse were used. Immediately after slaughter, each pair of ovaries was washed in ethanol (70%) for approximately 10 s, followed by two more washes in 0.9% saline solution, at 4°C, supplemented with penicillin (100 µg / ml) and streptomycin (100 µg / ml). After washing, each pair of ovaries was transported individually to the laboratory in falcon tubes containing α -MEM supplemented with penicillin (100 µg / ml) and streptomycin (100 µg / ml) within 1 hour. This study was approved and carried out in accordance with the rules and guidelines of the Ethics and Animal Welfare Committee of the Federal University of Ceará.

2.3 *Aloe vera* extract isolation

The *Aloe vera* extract used in the study was obtained from the leaves of the plant. For this, the *Aloe vera* plant was grown in a region with coordinates 3°45'49.3"S,

40°50'14.0"W, with temperatures ranging from 24° to 36°C, semi-arid tropical climate. For obtaining the extract, leaves at an intermediate stage of maturation were collected from plants using slides that were properly sanitized and later transported to the laboratory. In the laboratory, the leaves were washed with distilled water and had their surface part removed to expose the liquid and crystalline gel. After that, using gentle spoon movements, the gel was passed through a sieve and collected in a beaker until sufficient quantity was obtained, then transferred to a sterile 50 ml falcon tube and stored at 4°C until use. Before supplementation of the base medium, the extract was filtered, using filters with 45µm pores.

2.4 Ovarian tissue preparation

In laboratory, under sterile conditions, using scalpels n. 22, the cortex of each pair of ovaries (n = 10 pairs) was dissected from the medullary tissue and cut into fragments of approximately 3x3x1 mm in dissection medium composed of α -MEM supplemented with penicillin (100µg / ml) and streptomycin (100 µg / ml). For *in vivo* control, of each pair of ovaries, 4 fragments taken at random were immediately fixed in paraformaldehyde (4%) for 12 hours at 4°C, of which 2 were destined for histological analysis in which the morphology and follicular growth were observed and the others 2 were used to analyze the extracellular matrix (MEC); 2 were immediately incubated with calcein and homodimer ethidium - 1 for viability analysis and 2 were used for analysis of gene expression by RT-PCR. In addition, 6 were used to analyze the toxicity of the cryoprotectant. The remaining fragments were then cryopreserved by the solid surface vitrification method.

2.5 Assessment of cryoprotectant toxicity

From each pair of ovaries, 6 fragments (2 per treatment group per animal) were used to assess cryoprotectant toxicity. For this, the fragments were submitted to the vitrification solution (SV) for 5 minutes, at room temperature, with the respective concentrations of *Aloe vera* and cryoprotectant. After exposure to the vitrification solutions, the fragments underwent a cryoprotectant removal process, which was immersed in α -MEM medium containing fetal bovine serum and decreasing concentrations of sucrose (0.5M, 0.25M, 0M), for 5 minutes in each concentration. Subsequently, the samples were submitted to evaluation by classical histology in which the follicular morphology was evaluated, as well as the analysis of the extracellular matrix (MEC).

2.6 Vitrification and heating of ovarian tissue

The vitrification followed the methodology described by Carvalho et al. (2011) with modifications. Initially, the fragments were placed individually in wells containing 2 ml of vitrification solution (VS) composed of α -MEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 0.25mol / L of sucrose, 3M of dimethylsulfoxide (DMSO) and the following *Aloe vera* concentrations: Group 1: VS without *Aloe vera* (vitrified control – VS[AV0]); Group 2: VS supplemented with 10% *Aloe vera* (VS[AV10]); Group 3: VS supplemented with 50% *Aloe vera* (VS[AV50]). After 5 minutes of exposure to SV, the fragments were vitrified on a solid surface, in which one of the surfaces of a metal plate was placed in direct contact with liquid nitrogen and the fragment of ovarian tissue was brought into contact with the other surface of the metal, immediately switching to the glassy state. Then, the fragments were placed individually in cryotubes (2 ml) and stored in cryobiological cylinders (-196°C).

After two weeks of freezing, the samples were reheated. For this, the cryotubes were exposed to room temperature (25°C) for 1 minute and then quickly dipped in a water bath (37°C) to remove the ice formed around the cryotube. Then, the samples were incubated sequentially in wells containing 2 ml of α -MEM supplemented with 10% fetal bovine serum and decreasing concentrations of sucrose (0.5M, 0.25M, 0M), for 5 minutes each. After thawing, 2 fragments per treatment per animal were subjected to evaluation of morphology, viability, extracellular matrix and mRNA expression for antioxidant enzymes.

2.7 *In vitro* culture post vitrification

To assess the capacity of follicular development as well as the extracellular matrix after vitrification, 2 fragments per treatment per animal were subjected to *in vitro* culture. Ovarian fragments were cultured for 6 days in 24-well plates (TPP 920124) in α -MEM medium supplemented with BSA (1.25 mg / ml) glutamine (2mM), hypoxanthine (2mM), penicillin / streptomycin (100 μ g / ml), ascorbic acid (50 μ g / ml), insulin (10 μ g / ml), transferrin (5.5 μ g / ml), selenium (10 μ g / ml). Cultivation conditions were at 38.5°C with 5% CO₂ in air. The culture medium was stabilized at 38.5°C for 4 hours before use and, every 2 days of cultivation, 60% of the medium in each well was replaced with fresh medium. After the end of the culture period in each treatment, the fragments were sent to the same evaluations performed for the *in vivo* control.

2.8 Morphological analyses and assessment of *in vitro* follicular growth

Fresh control (D0) and vitrified and cultured fragments, after fixation in paraformaldehyde (4%), at 4°C, for 24 hours, were dehydrated in increasing concentrations of ethanol, cleared using xylol and included in histological paraffin and sectioned in series with thickness of 6 µm. At each 5th section, slides were mounted which were stained with hematoxylin and eosin. Only pre-antral follicles whose oocytes had an evident nucleus in the section observed were analyzed to avoid double counting. For all analyzes, the examiner was blinded to the treatment groups. The analysis of the follicles in the tissue fragments was performed in all sections under an optical microscope (Nikon, Eclipse, TS 100, Japan) under 400x magnification. The classification of healthy follicles was based on the same criteria as Telfer et al. (2008) with changes. For the follicles to be categorized as morphologically normal, the oocyte had to be roughly circular surrounded by a pellucid zone, absence of pycnotic bodies and cytoplasmic retraction. In addition, the degree of organization of the surrounding granulosa cells was considered. Degenerate follicles were defined as those with a retracted oocyte, presence of pycnotic nucleus and/or were surrounded by disorganized granulosa cells, detached from the basement membrane (CAVALCANTE et al., 2019).

The stage of follicular development was categorized based on (FIGUEIREDO et al., 2008). The follicles were classified as primordial (oocyte surrounded by a layer of flattened granulosa cells), primary (oocyte surrounded by a layer of cubic granulosa cells) and secondary (oocytes surrounded by two or more complete layers of cubic granulosa cells). The proportion of follicles at different stages of development was defined as a percentage of morphologically healthy follicles over the total follicle count.

2.9 Analysis of extracellular matrix after vitrification

In order to evaluate the collagen fibers of the extracellular matrix of the ovarian cortex, staining with Picrosirius Red (Abcam Kit) was performed following the methodology described by Rittié (2017) with modifications. Briefly, 6 µm ovarian sections were dewaxed in xylol and incubated in Sirius Red solution (0.1%) for 1 hour at room temperature. Then, the excess dye was removed with acetic acid solution (0.5%) and the sections were then dehydrated and subjected to slide assembly with subsequent observation under an optical microscope (Nikon, Eclipse, TS 100, Japan) under 400x magnification. For each treatment, the percentage of the area occupied by collagen fibers in ten different fields was measured with the

aid of a DS Cooled Camera Head DS-Ri1 coupled to a Nikon, Eclipse, TS 100, Japan microscope and the images were analyzed by Image J Software (Version 1.51p, 2017) with 400x magnification. Only the collagen fibers were marked in red with the picosirius stain, while the follicles remained uncolored (white). The analyzer software automatically excluded the circumference of the unstained follicles from the total area marked in red.

2.10 Assessment of pre-antral follicles viability by fluorescence microscopy

After heating the samples, ovarian fragments were incubated in 30 μ l drops of PBS supplemented with 4 mM of calcein-AM and 2 mM of ethidium homodimer-1 (Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe, Germany) at 37 ° C for a period 15 minutes. Then, the fragments were washed three times in PBS and then examined under a fluorescence microscope (Nikon, Eclipse, TS 100, Japan). Oocytes and granulosa cells were considered viable if the cytoplasm were positively stained with calcein AM (green) and unviable if the chromatin was positively labeled with ethidium-1 homodimer (red) (VAN DEN HURK et al., 1998).

2.11 Expression of mRNA for *SOD*, *CAT*, *PRDX6* and *GPX1* in ovarian tissue

For analysis of gene expression, ovarian tissue was stored at -80°C immediately after heating the samples until the extraction of total RNA for further analysis of the expression of SOD, CAT, PRDX6 and GPX1. For this, the tissue was macerated using scalpels under sterile conditions and then subjected to extraction of the total RNA that was performed using a Trizol® purification kit (Invitrogen, São Paulo, Brazil) in accordance with the manufacturer's instructions. Quantification of mRNA was performed using SYBR Green. PCR reactions were composed of 1 μ L cDNA as a template in 7.5 μ L of SYBR Green Master Mix (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 5.5 μ L of ultra-pure water, and 0.5 μ M of each primer. The primers were designed by using the Primer Quest SM program (<http://www.idtdna.com>) to perform amplification of SOD, CAT, PRDX6, GPX1 and GAPDH (Table 1). The specificity of each primer pair was confirmed by melting curve analysis of PCR products. The thermal cycling profile for the first round of PCR was initial denaturation and activation of the polymerase for 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 sat 95°C, 30 sat 58°C, and 30 sat 72°C. The final extension was for 10 min at 72°C. All reactions were performed in a Step One Plus instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

The $\Delta\Delta C_t$ method was used to transform the C_t values into normalized relative expression levels (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

Table 1 – Primers pairs used for real-time PCR.

Target gene	Primer sequence (5' → 3')	Sense (S), anti-sense (As)	GenBank ac- cession no.
<i>GAPDH</i>	TGTTTGTGATGGGCGTGAACCA ATGGCGCGTGGACAGTGGTCATAA	S As	GI: 402744670
<i>PRDX6</i>	GCACCTCCTCTTACTTCCCG GATGCGGCCGATGGTAGTAT	S As	GI: 59858298
<i>GPX1</i>	AACGTAGCATCGCTCTGAGG GATGCCCAAACCTGGTTGCAG	S As	GI:156602645
<i>SOD</i>	GTGAACAACCTCAACGTCGC GGTTCTCCACCACCGTTAG	S As	GI: 31341527
<i>CAT</i>	AAGTTCTGCATCGCCACTCA GGGGCCCTACTGTCAGACTA	S As	GI:402693375

2.12 Statistical analysis

The statistical analysis was performed using the computer program GraphPad Prisma (5.0). Data that did not show a normal distribution, selected by the Shapiro-Wilk test, underwent logarithmic transformation. The parametric variables of the average percentage of normal follicles, follicular class and follicular activation in each treatment were evaluated by the Tukey test and the comparison between treatments using the Kruskal-Wallis. For an analysis of collagen fibers and expression PCR data were analyzed by the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's comparison. The differences were statistically significant when $p < 0.05$.

3. RESULTS

3.1 Effect of dimethylsulfoxide on follicular morphology and extracellular matrix

The histological analysis of the ovarian fragments after incubation in the vitrification solution supplemented with the cryoprotective agent (DMSO) demonstrated that there was no damage to the maintenance of the normal follicular structure, regardless of the concentration of *Aloe vera* used. In all treatments, high rates of morphologically healthy follicles (over 94%) similar to the fresh control were observed (Figure 1, $P < 0.05$).

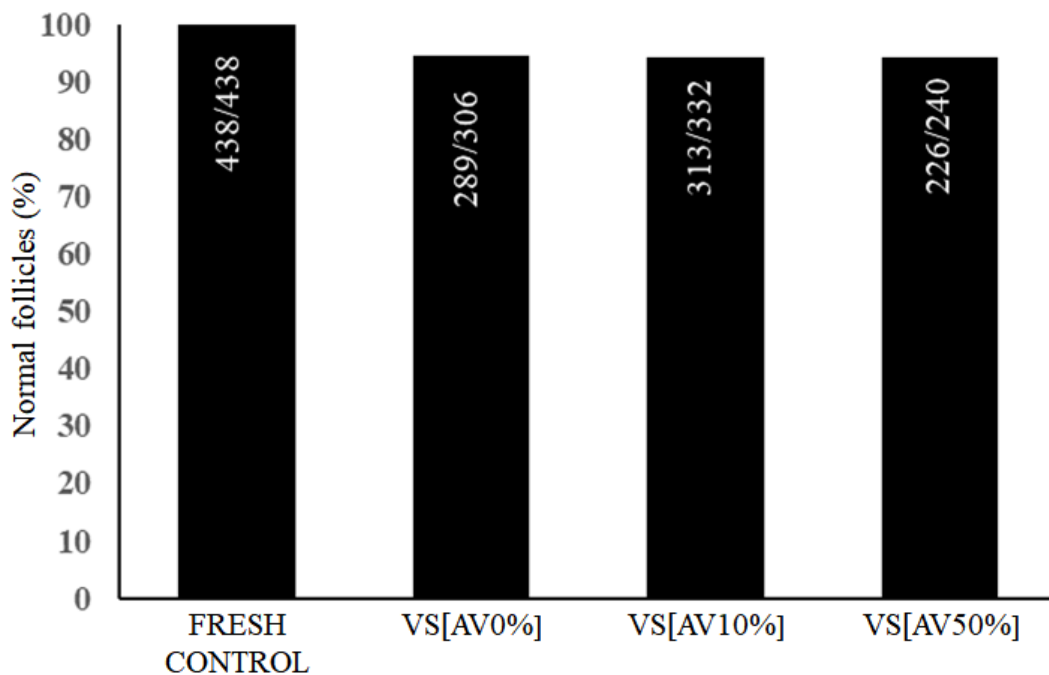


Figure 1. Percentages (mean \pm SE) of morphologically healthy follicles in the fresh control (tissue not subjected to cryoprotectant) and in different treatment groups after contact with the cryoprotectant: vitrification solution without *Aloe vera* (VS[AV0%]); vitrification solution with 10% *Aloe vera* (VS[AV10%]) and vitrification solution with 50% *Aloe vera* (VS[AV50%]). ($P < 0.05$).

When the density of the extracellular matrix was evaluated, it was possible to verify that the presence of 10% of *Aloe vera* maintained levels of collagen in the tissue similar to that observed in the fresh control (Figure 2, $P < 0.05$).

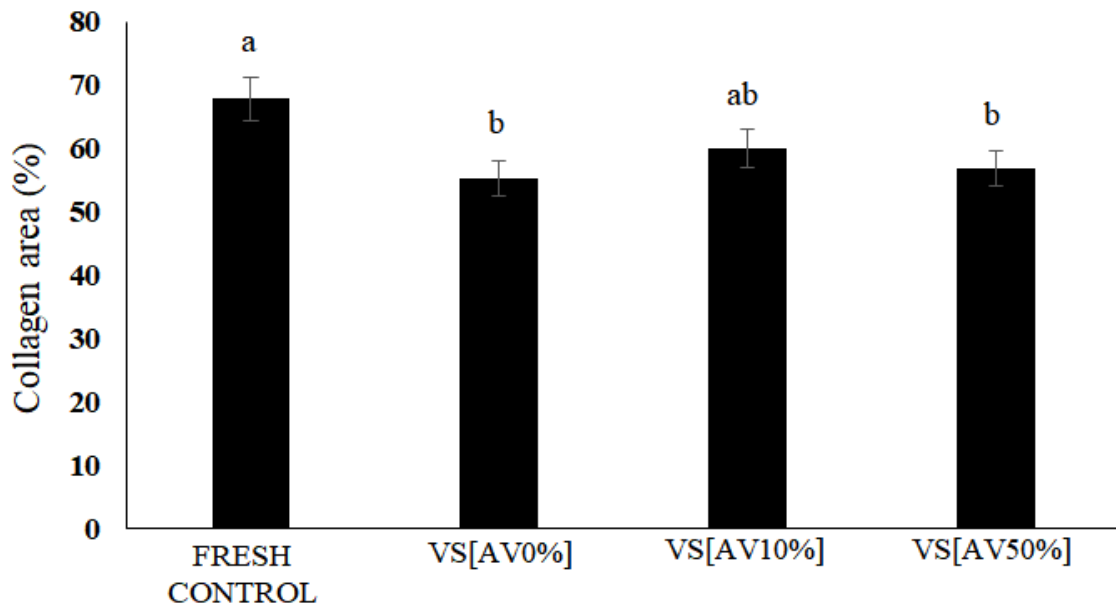


Figure 2. Collagen levels (mean \pm SE) in the ovarian tissue analyzed by the picosirius red in the fresh control (tissue not subjected to cryoprotectant) and in different treatment groups after contact with the cryoprotectant: vitrification solution without *Aloe vera* (VS[AV0%]); vitrification solution with 10% *Aloe vera* (VS[AV10%]) and vitrification solution with 50% *Aloe vera* (VS[AV50%]). a,b,c Different letters indicate significant difference between treatments ($P < 0.05$).

3.2 Effect of *Aloe vera* on follicular distribution, viability and extracellular matrix after vitrification of ovarian tissue

When analyzing the percentage of follicular classification after the vitrification procedure, it was found that the presence of *Aloe vera* in the vitrification solution did not influence the levels of primordial and primary follicles that were morphologically normal. However, the 10% concentration of *Aloe vera* promoted better rates of morphologically healthy secondary follicles in comparison with the fresh control (Figure 3, $P < 0.05$).

In addition, microscopic fluorescence analysis using calcein-AM and homodimer ethidium-1 showed that the follicles after cryopreservation using vitrification solutions supplemented with different concentrations of *Aloe vera* were viable, as they stained positively in the calcein - AM, as well as observed in the control group (Figure 4).

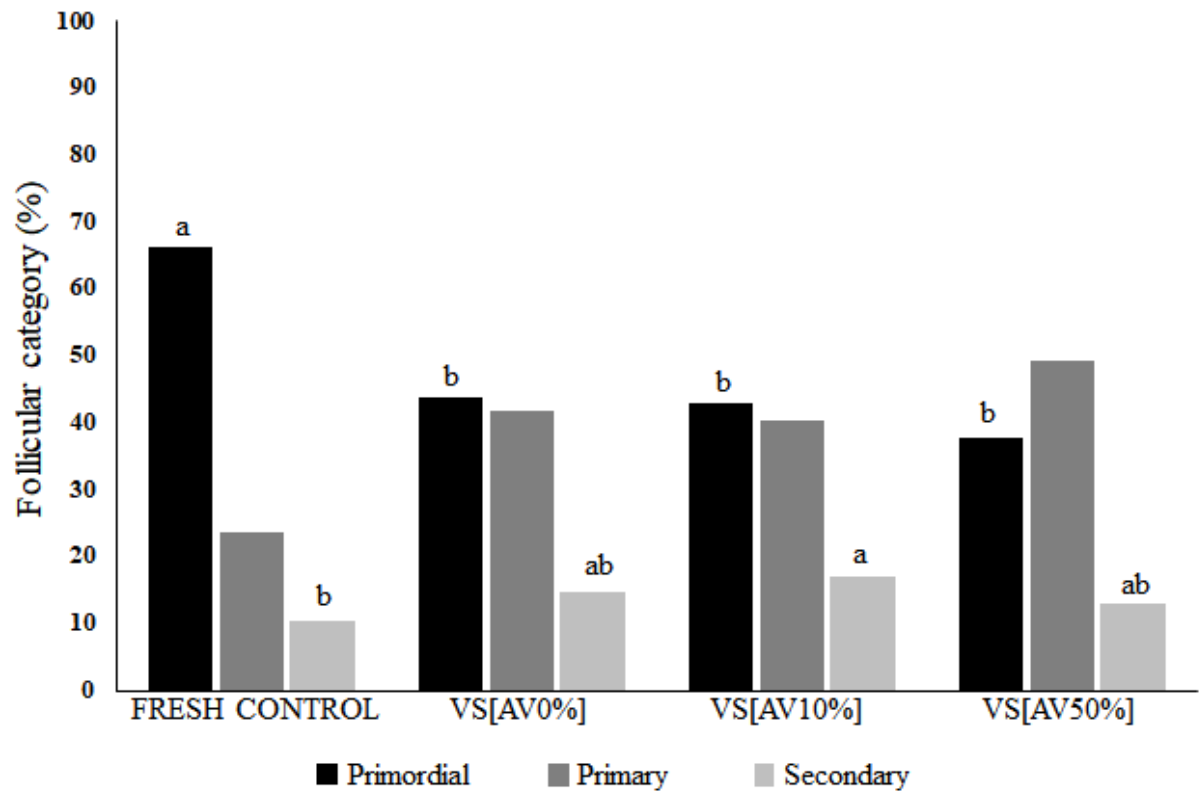


Figure 3. Percentages (mean \pm SE) of morphologically healthy follicles in different follicular categories in the fresh control (non-vitrified tissue) and in different treatment groups after vitrification: vitrification solution without *Aloe vera* (VS[AV0%]); vitrification solution with 10% *Aloe vera* (VS[AV10%]) and vitrification solution with 50% *Aloe vera* (VS[AV50%]). ($P < 0.05$). a,b,c Different letters indicate significant difference between treatments ($P < 0.05$).

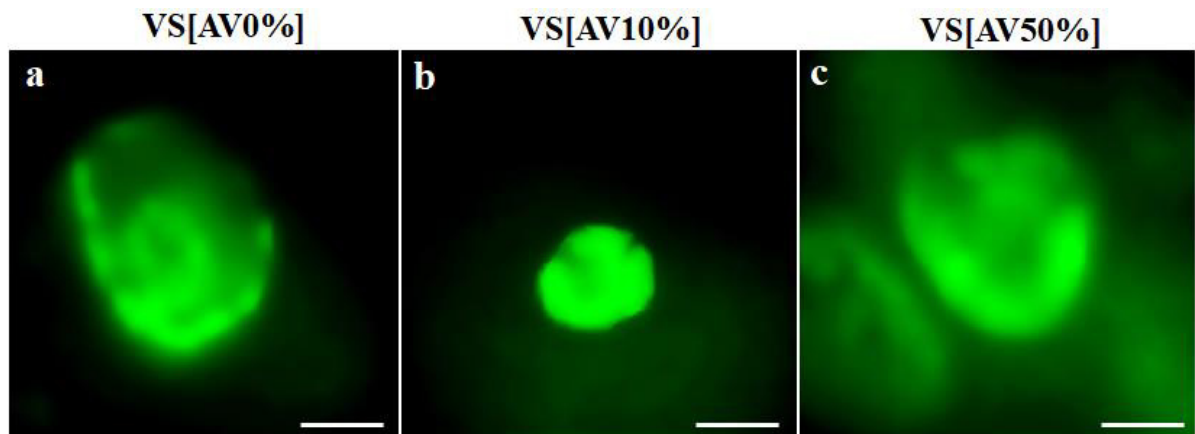


Figure 4. Viable bovine follicles in different follicular categories in different treatment groups after vitrification: vitrification solution without *Aloe vera* (VS[AV0%]); vitrification solution with 10% *Aloe vera* (VS[AV10%]) and vitrification solution with 50% *Aloe vera* (VS[AV50%])

The levels of collagen in the ovarian tissue after vitrification are shown in Figure 5 A and B, where it is possible to observe that the presence of *Aloe vera* in both concentrations was able to maintain percentages of collagen similar to the fresh control ($P < 0.05$).

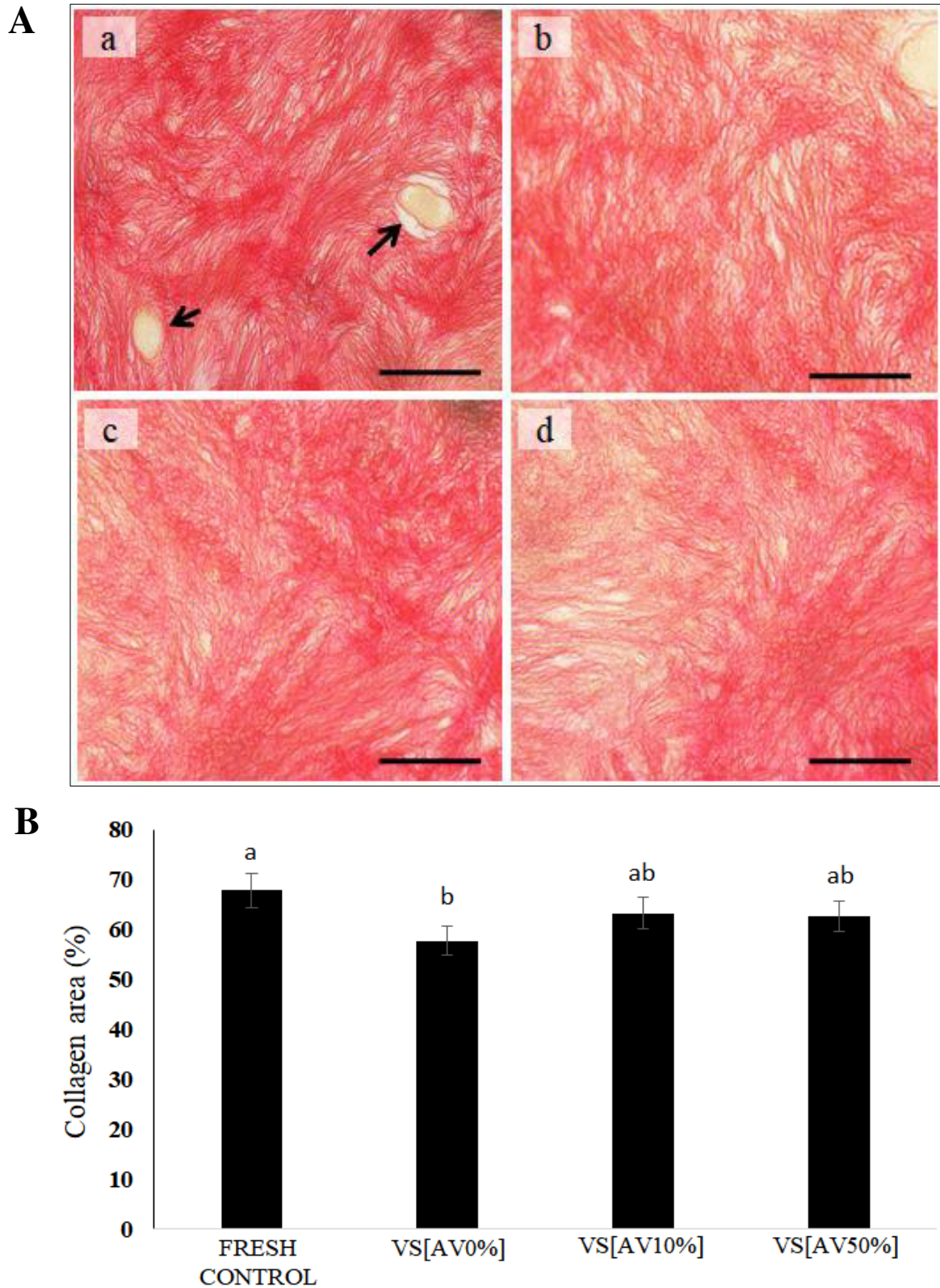


Figure 5. (A) Representative images of collagen fibers labeled by red spots of picosirius and observed under optical microscopy (400x). Fresh control (a); VS[AV0%] (b); VS[AV10%] (c) and VS[AV50%] (d). The black arrows show the colorless follicular area. Scale bar: 100 μ m. (B) Collagen levels (mean \pm SE) in the ovarian tissue analyzed by the picosirius red in the fresh control (non-vitrified tissue) and in different treatment groups after vitrification: vitrification solution without *Aloe vera* (VS[AV0]); vitrification solution with 10% *Aloe vera* (VS[AV10]) and vitrification solution with 50% *Aloe vera* (VS[AV50]). a,b,c Different letters indicate significant difference between treatments ($p < 0.05$).

3.3 Expression of mRNA for SOD, CAT, PRDX6 and GPX1 after vitrification of ovarian tissue

The levels of mRNA for *SOD*, *CAT*, *PRDX6* and *GPX1* expressed in cryopreserved bovine ovarian tissue in vitrification solution with or without the presence of *Aloe vera* are shown in Figure 6. The presence of *Aloe vera* did not influence the levels of *CAT* mRNA in the compared to fresh and cryopreserved controls. However, supplementation with *Aloe vera*, at both concentrations, significantly increased mRNA levels for *PRDX6* and *GPX1*. In addition, the presence of 10% *Aloe vera* showed a significant increase in mRNA levels for *SOD* in comparison with the fresh control ($P < 0.05$).

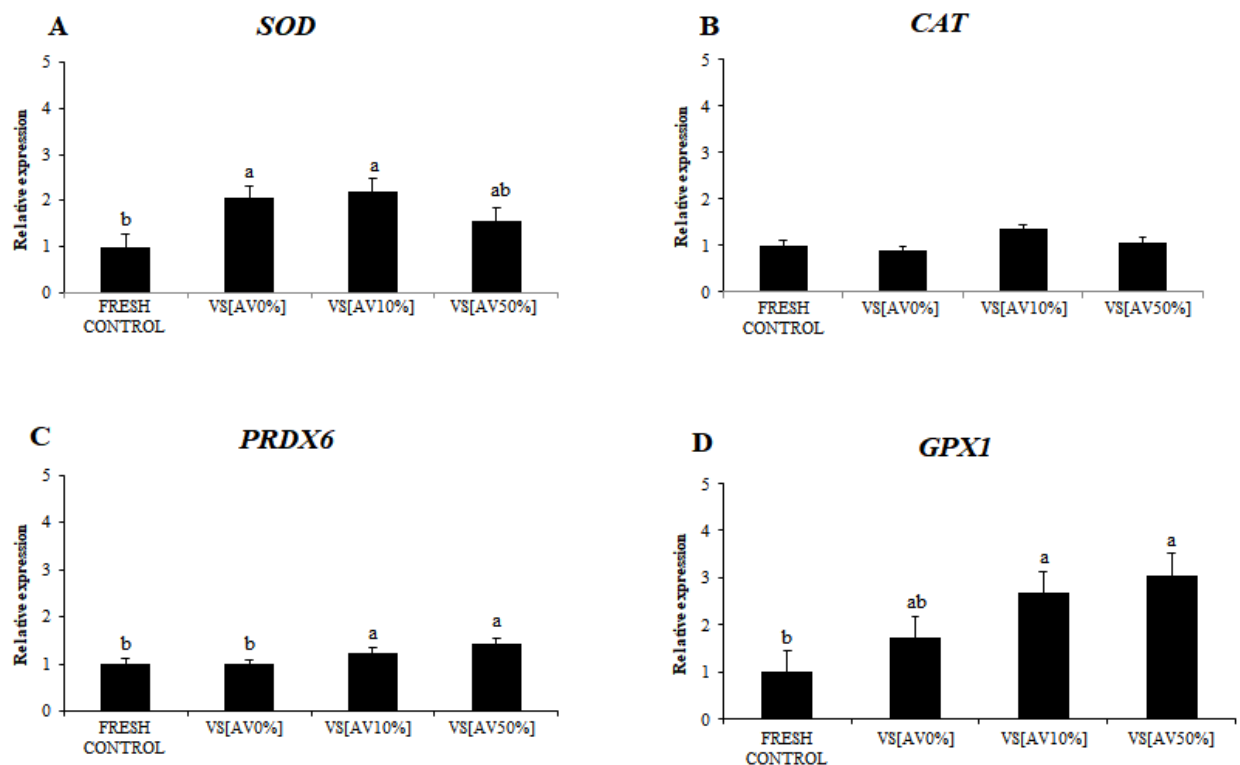


Figure 6. Levels of mRNA (means \pm SE) for SOD (A), CAT (B), PRDX6 (C) and GPX1 (D) in the fresh control (non-vitrified tissue) and in different treatment groups after vitrification: vitrification solution without *Aloe vera* (VS[AV0%]); vitrification solution with 10% *Aloe vera* (VS[AV10%]) and vitrification solution with 50% *Aloe vera* (VS[AV50%]). a,b,c Different letters indicate significant difference between treatments ($P < 0.05$).

3.4 Effect of *Aloe vera* on follicular morphology, development and extracellular matrix after *in vitro* culture of vitrified ovarian tissue

To verify the morphology, a total of 928 follicles were analyzed. Morphologically normal follicles in the different categories exhibited oocyte with central nucleus and granulosa cells intact and organized, while degenerated follicles showed nuclear pycnosis and / or cytoplasmic retraction or disorganization of the granulosa cells (Figure 7). No antral follicles were found in any fragment.

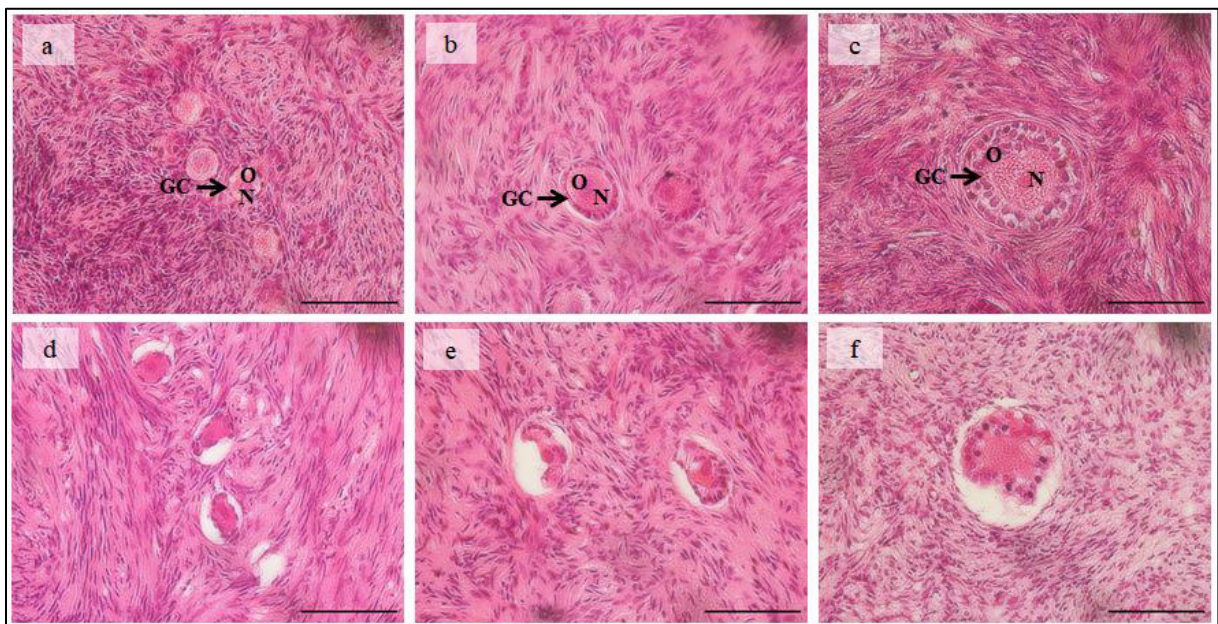


Figure 7. Representative images of sections of vitrified and cultured bovine ovarian tissue showing morphologically normal (a-c) and degenerate (d-f) follicles from different categories stained with hematoxylin and eosin. Normal primordial follicles (a) and degenerate (d); normal (b) and degenerate (e) primaries; normal (c) and degenerate (f) secondary. Granulosa cells (GC); oocyte (O); oocyte nucleus (N). Scale bar: 100 μ m.

A significant reduction in the percentage of normal follicles in all treatments at the end of the culture period was observed. However, fragments vitrified in the presence of 10% *Aloe vera* provided significantly higher levels of morphologically healthy follicles compared to fragments that were grown without *Aloe vera* (Figure 8, $P < 0.05$). When the rates of follicular activation and development were assessed, a significant difference was observed in the levels of primordial follicles in all treatments compared to the fresh control (Figure 9) ($P < 0.05$). However, in treatments with the presence of *Aloe vera*, the development rate was significantly higher than the group without *Aloe vera* and similar to the control group (Figure 10) ($P < 0.05$).

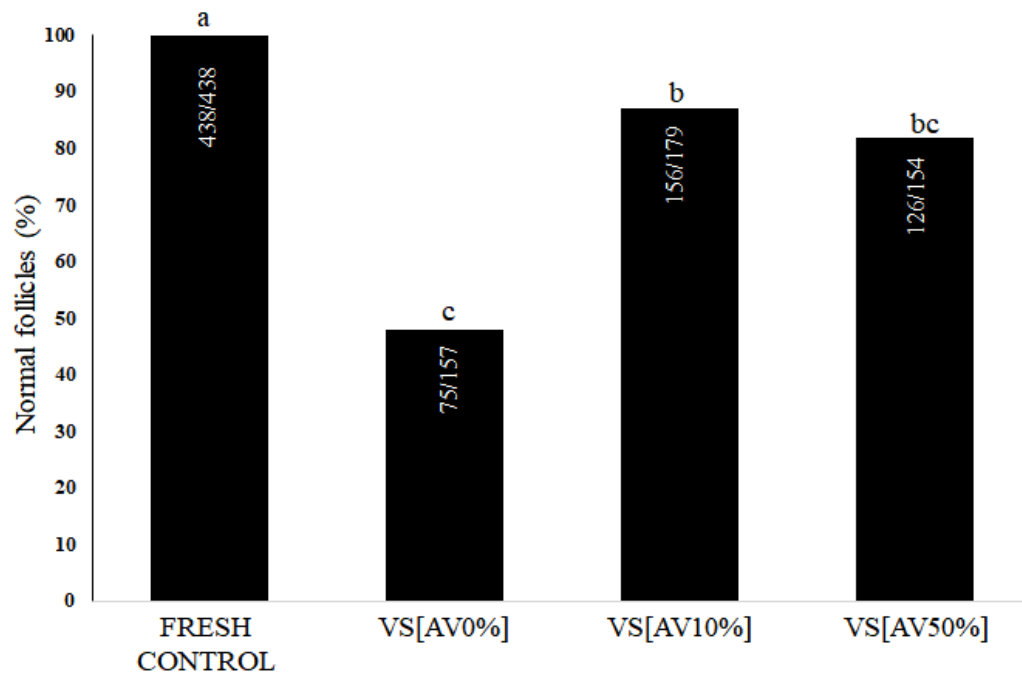


Figure 8. Percentages (mean \pm SE) of morphologically healthy follicles in the fresh control (non-vitrified and uncultivated tissue) and in different treatment groups after vitrification and *in vitro* culture of ovarian tissue: vitrification solution without *Aloe vera* (VS[AV0%]); vitrification solution with 10% *Aloe vera* (VS[AV10%]) and vitrification solution with 50% *Aloe vera* (VS[AV50%]). a,b,c Different letters indicate significant difference between treatments ($P < 0.05$).

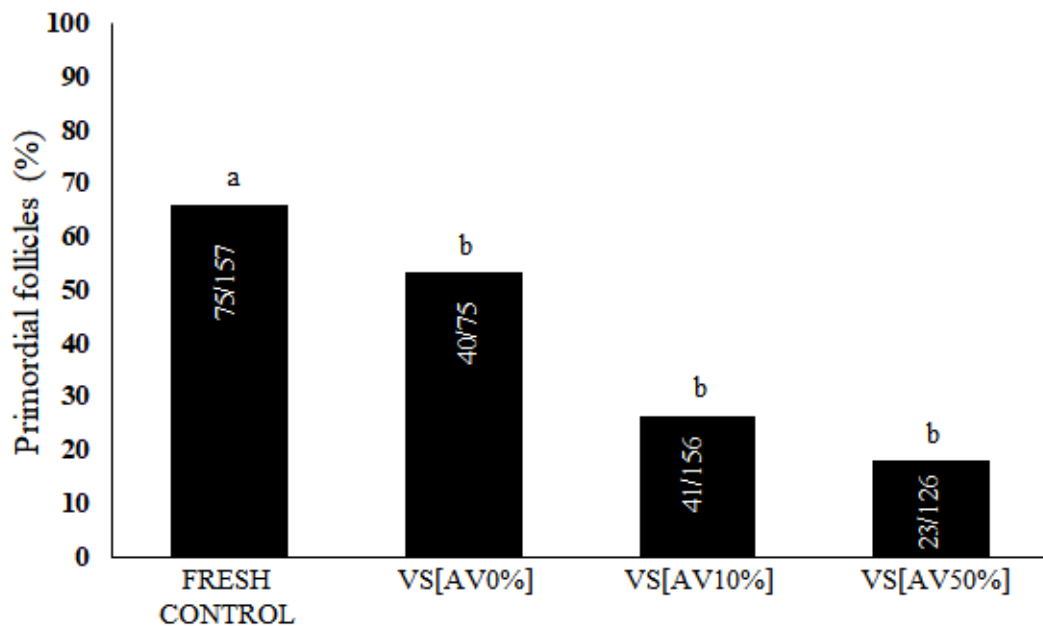


Figure 9. Percentage (mean \pm SE) of morphologically healthy primordial follicles in the fresh control (non-vitrified and uncultivated tissue) and in different treatment groups after vitrification and *in vitro* culture of ovarian tissue: vitrification solution without *Aloe vera* (VS[AV0]); vitrification solution with 10% *Aloe vera* (VS[AV10]) and vitrification solution with 50% *Aloe vera* (VS[AV50]). a,b,c Different letters indicate significant difference between treatments ($P < 0.05$).

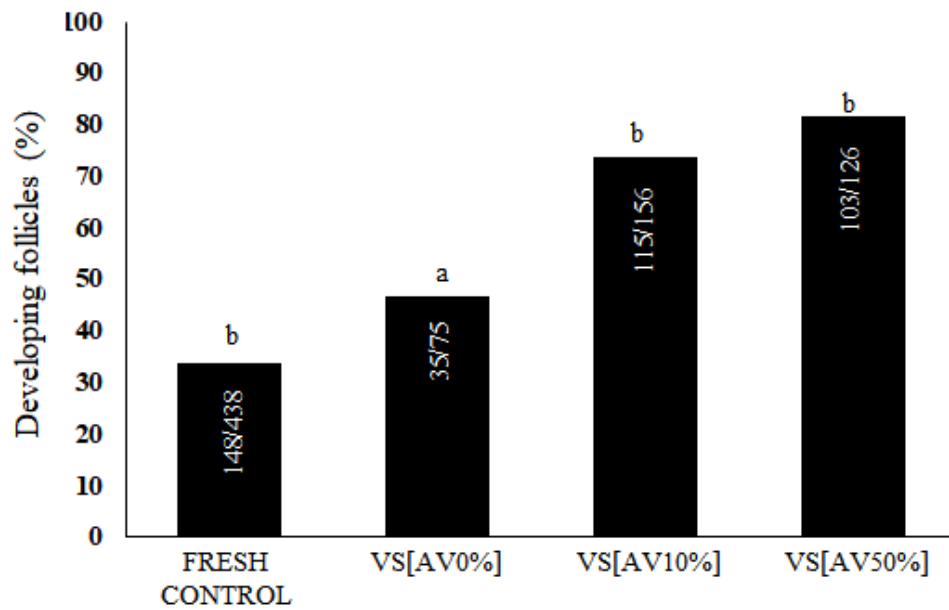


Figure 10. Percentage (means \pm SE) of morphologically healthy developing follicles in the fresh control (non-vitrified and uncultivated tissue) and in different treatment groups after vitrification and *in vitro* culture of ovarian tissue: vitrification solution without *Aloe vera* (VS[AV0]); vitrification solution with 10% *Aloe vera* (VS[AV10]) and vitrification solution with 50% *Aloe vera* (VS[AV50]). a,b,c Different letters indicate significant difference between treatments ($P < 0.05$).

The analysis of the extracellular matrix of the tissue grown for 6 days after vitrification is shown in Figure 11. At the end of the culture period, the fragments that were cryopreserved after incubation in a vitrification solution with the presence of *Aloe vera* maintained percentages of collagen similar to fresh control. However, the 50% concentration of *Aloe vera* showed no statistically significant difference when compared to the group without *Aloe vera* ($P < 0.05$).

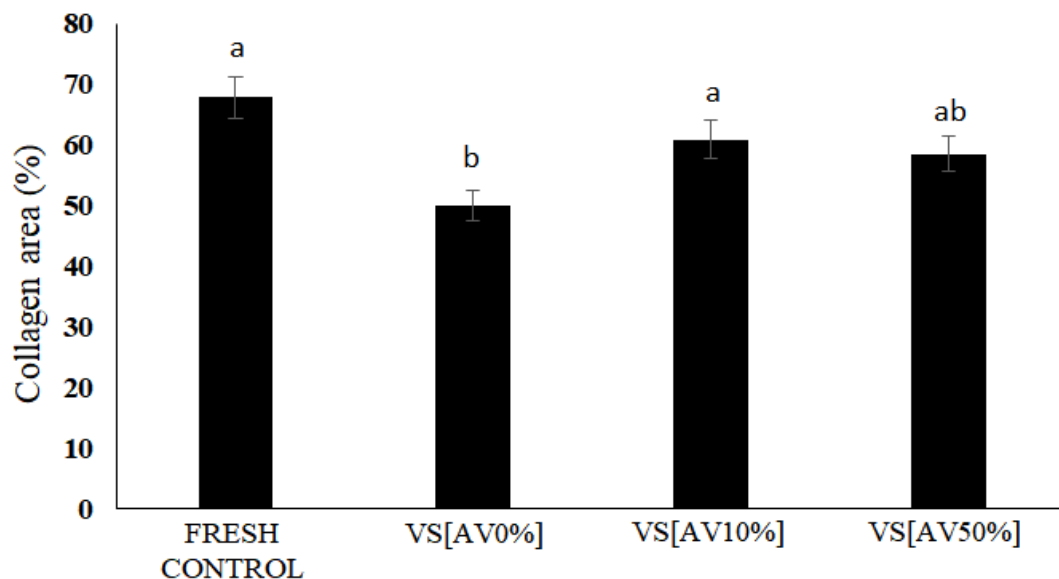


Figure 11. Collagen levels (mean \pm SE) in the ovarian tissue analyzed by the picosirius red in the fresh control (non-vitrified and uncultivated tissue) and in different treatment groups after vitrification and culture: vitrification solution without *Aloe vera* (VS[AV0]); vitrification solution with 10% *Aloe vera* (VS[AV10]) and vitrification solution with 50% *Aloe vera* (VS[AV50]). ($P < 0.05$). a,b,c Different letters indicate significant difference between treatments ($p < 0.05$).

4. DISCUSSION

Although *Aloe vera* has traditionally been used as a curative agent for its various pharmacological activities, there are still gaps in knowledge about the mechanisms of action of the plant extract at the cellular and tissue level (TEPLICKI et al., 2018). This gap is even greater when it comes to studies that evaluate the effect of this plant as a supplement of means for cryopreservation of ovarian tissue. To date, this study is a pioneer in evaluating the effect of *Aloe vera* on the vitrification of bovine ovarian tissue.

A disadvantage of the vitrification procedure is the toxicity of the cryoprotective agents. Therefore, one of the main concerns when establishing cryopreservation protocols is to determine the ideal cryoprotectant as well as to find the most appropriate concentration of this cryoprotectant. In our study we showed that the presence of 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) in the vitrification solution, alone or in combination with *Aloe vera*, did not affect follicular health or the maintenance of tissue structure in any of the concentrations of *Aloe vera* used, as demonstrated by the high indices of morphologically healthy follicles and the levels of extracellular matrix collagen in the ovarian tissue in proportions similar to the fresh control. These findings suggest that there are no significant deleterious effects in the association of 10% DMSO with the concentrations of 10% and 50% of *Aloe vera* in vitrification solution on cell and tissue morphological parameters.

We also found that the presence of *Aloe vera* extract in the vitrification solution was able to maintain the collagen levels of the extracellular matrix in the ovarian tissue in proportions similar to the fresh control. The extracellular matrix (MEC) is a complex network of proteins, with emphasis on collagen, polysaccharides and water that comprises the acellular stromal micro-environment of all tissues (ALAMGEER, et al., 2019). In fact, MEC not only serves as a network for stabilizing the physical structure of tissues, but also plays an important role in cell-cell and cell-matrix interactions, thus directing cellular destiny and influencing the development and homeostasis of the fabric (MUN-CIE; WEAVER, 2019). Thus, stroma maintenance is of fundamental importance for the survival of follicular structures and the female gamete after cryopreservation of ovarian tissue. Damage to the structure of collagen can occur due to the unregulated expression of a class of enzymes known as metalloproteinases (MMPs) which, in normal physiological situations, are regulated by tissue metalloproteinase inhibitors (TIMPs), however this regulation can be impaired, for example, in oxidative stress situations (PROVENZANO et al., 2020) that favor the action of metalloproteinases (JABLONSKA-TRYPUC et a., 2016). A recent study by Chul-Hong et al. (2017) showed that

Aloe vera was able to suppress tissue levels of mRNA for MMP-9 as well as levels of the enzyme itself in mouse models while maintaining tissue structure within acceptable parameters. In addition, it has been reported that *Aloe vera* strongly stimulated the proliferation of human dermal fibroblasts (TEPLICKI et al., 2018). This effect is important in view of the role of these cells in the production of collagen in the matrix (JIA et al., 2018). Reports also point out that *Aloe vera* has also been found to increase the content of type III collagen in tissues (SIGAROODI et al., 2019) and that acemannan, a polysaccharide present in *Aloe vera* gel, stimulates the extracellular matrix synthesis (BO-ONYAGUL et al., 2014).

In general, the presence of *Aloe vera* in the vitrification solution was able to provide higher rates of activation and follicular development than those observed in the group without *Aloe vera*. Several studies have shown that the transition from primordial follicles at rest to the growth stages is a very dynamic and still poorly understood process. It has already been suggested that fragmentation of ovarian tissue promotes an increase in actin polymerization, which interrupts the Hippo signaling pathway and leads to increased expression of growth factors, including connective tissue growth factor (CTGF or CCN2) and overexpression nephroblastoma (NOV or CCN3) (KAWAMURA et al., 2013). Study conducted by Hsueh et al. (2015) showed that the secretion of CCN2 and related factors was able to promote the growth of primordial follicles in vitro. Another signaling pathway whose role in follicular activation is already well established is PI3K / Akt (HSUEH et al., 2015). The activation of this pathway leads to the activation of its Akt component, a protein kinase serine / threonine that increases cell proliferation and survival (MAIDARTI et al., 2019). Previous studies have already shown that activation of this pathway is an important requirement in promoting follicular growth (GROSBOIS; DEMEESTERE, 2018; MCLAUGHLIN et al., 2014).

Aloe vera promoted a significant increase in mRNA levels for *PRDX6*, *GPXI* and *SOD*, and low expression for *CAT*. In cells and tissues, peroxidases are involved in antioxidant defense and intracellular signaling through their activities of alkyl and hydrogen peroxide reductase (LEYENS ET AL., 2004). As for peroxidoxin 6 (Prdx6, 1-cys peroxiredoxin), whose mRNA expression was significantly increased in both concentrations of *Aloe vera* used in this study, it is known that it is an exclusive member of the peroxiredoxin family and is widely expressed in all tissues, being the only peroxiredoxin capable of reducing phospholipid hydroperoxides through the activity of glutathione peroxidase (*GPX*) (AREVALO; VÁZQUEZ-MEDINA, 2018). Other enzymes involved in antioxidant defense including *GPXI*, *SOD* and *CAT* have an important role in regulating ROS levels in the intracellular en-

vironment. Among them, *GPX1*, a widely expressed and important member in the metabolism of ROS (CHEN et al., 2019). *SOD* catalyzes the dismutation of the superoxide anion (O_2^-) to oxygen (O_2) and hydrogen peroxide (H_2O_2), the latter being eliminated by glutathione peroxidase or catalase. Because of this, it is an important antioxidant defense in most cells exposed to oxygen (JOHNSON; GIULIVI, 2005; MCCORD; EDEAS, 2005). *Aloe vera* ability to increase mRNA levels for this enzyme in a study with rats has already been verified (BIRDEN et al., 2012). In male reproductive cells of mice, an improved effect on *SOD* levels by *Aloe vera* has also been reported (BEHMANESH et al., 2018; BALA et al., 2016). Corroborating these reports, the same effect was observed in human skin fibroblasts where *SOD* overexpression was associated with a reduction in oxidative damage to lipids and DNA (LIU et al., 2015). In general, the improved expression of mRNA for antioxidant enzymes may be related to the maintenance of follicular and tissue morphology and viability observed in our investigation.

Given the above, it is concluded that the presence of *Aloe vera* in the vitrification solution improved the overall quality of the follicle and ovarian tissue, reestablishing follicular development and activation after the cultivation of the vitrified tissue. Furthermore, the marked expression of important genes, known to be involved in oxidative stress processes, suggests the potential antioxidant effect of the plant extract. A general evaluation of the analyzes made it possible to suggest the concentration of 10% of *Aloe vera* for the solution of vitrification of bovine ovarian tissue.

Acknowledgments

This research was supported by the Cearense Foundation for Support for Scientific and Technological Development (Funcap).

REFERENCES

- ABEDELAKHI A. et al. Sodium selenite improves the in vitro follicular development by reducing the reactive oxygen species level and increasing the total antioxidant capacity and glutathione peroxidase activity. **Hum Reprod.** V.25, p.977–985, 2010.
- ALAMGEER, S.T. et al. Phytochemicals targeting matrix metalloproteinases regulating tissue degradation in inflammation and rheumatoid arthritis. **Phytochemistry**, 2019.
- AREVALO, J.A.; VÁZQUEZ-MEDINA, J.P. The Role of Peroxiredoxin 6 in Cell Signaling. **Antioxidants (Basel)**. v. 7, n. 12, p. 172, 2018.
- AYE, M. et al. Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: Dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1905-1912, 2010.
- BALA, S. et al. Protective role of Aloe vera against X-ray induced testicular dysfunction. **Andrologia**, v. 49(7), p. 1-16, 2016.
- BECK, K. et al. Angiogenesis and follicular development in ovarian tissue of cattle following vitrification and post-warming culture on chicken chorioallantoic membrane. **Animal Reproduction Science**, v. 212, 2020.
- BEHMANESH, M.A. et al. Protective effect of *Aloe vera* extract against bisphenol A induced testicular toxicity in wistar rats. **Cell Journal(Yakhteh)**, V. 20(2), p.278-283, 2018.
- BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organ J**, v.5(1), p. 9-19, 2012.
- BOONYAGUL, S. et al. Effect of acemannan, an extracted polysaccharide from Aloe vera, on BMSCs proliferation, differentiation, extracellular matrix synthesis, mineralization, and bone formation in a tooth extraction model. **Odontology**, V. 102(2), p. 310-317, 2014.
- CASTILLO-MARTÍN, M. et al. Supplementing culture and vitrification-warming media with l ascorbic acid enhances survival rates and redox status of IVP porcine blastocysts via induction of GPX1 and SOD1 expression, **Cryobiology**, v. 68, p. 451–458, 2014.
- CHEN, B. et al. Glutathione Peroxidase 1 Promotes NSCLC Resistance to Cisplatin via ROS-Induced Activation of PI3K/AKT Pathway. **BioMed Research International**, 2019.
- CHINNADURAI, R. et al. Actin cytoskeletal disruption following cryopreservation alters the biodistribution of human mesenchymal stromal cells *in vivo*. **Stem Cell Rep.** v.3, p. 60–72, 2014.
- CHUL-HONG, P. et al. Low molecular-weight gel fraction of *Aloe vera* exhibits gastroprotection by inducing matrix metalloproteinase-9 inhibitory activity in alcohol-induced acute gastric lesion tissues. **Pharmaceutical Biology**, v.55(1), p. 2110-2115, 2017.
- DEGHANI-MOHAMMADABADI, M. et al., Melatonin modulates the expression of BCL-xl and improve the development of vitrified embryos obtained by IVF in mice, **J. Assist. Reprod. Genet.** V.31, p.453–461, 2014.

- DE MUNCK, N. et al. Chromosomal meiotic segregation, embryonic developmental kinetics and DNA (hydroxyl) methylation analysis consolidate the safety of human oocyte vitrification. **MHR Basic Sci. Reprod. Med.** V. 21, p. 535-544, 2015.
- DE VOS, M. et al. Fertility preservation in women with cancer. **Lancet.** V.384, p.1302–1310, 2014.
- FABBRI, R. Cryopreservation of human oocytes and ovarian tissue. **Cell Tissue Bank**, v.7, p.113-122, 2006.
- FABBRI, R. Good preservation of stromal cells and no apoptosis in human ovarian tissue after vitrification, **BioMed Res. Int.** v.2014, 2014.
- GERRITSE, R. et al. Optimal perfusion of an intact ovary as a prerequisite for successful ovarian cryopreservation. **Hum. Reprod.** V. 23, p. 329-335, 2007.
- GIARETTA E. et al. Effects of resveratrol on vitrified porcine oocytes. **Oxid Med Cell Longev** 920257, 2013.
- GRSBOIS, J; DEMEESTERE, I. Dynamics of PI3K and Hippo signaling pathways during in vitro human follicle activation, **Human Reproduction**, v. 33(9), p. 1705-1714, 2018.
- GUPTA, M.K. et al. Effect of vitrification and beta-mercaptoethanol on reactive oxygen species activity and in vitro development of oocytes vitrified before or after in vitro fertilization. **Fertil Steril**, v. 93, p.2602–7, 2010.
- HARA, T. et al. Resveratrol enhances the clearance of mitochondrial damage by vitrification and improves the development of vitrified-warmed bovine embryos. **PLoS One**, v.13(10), 2018.
- HATAMI, S. et al. Comparison of oxidative status of mouse pre-antral follicles derived from vitrified whole ovarian tissue and vitrified pre-antral follicles in the presence of alpha lipoic acid. **J Obstet Gynaecol Res.** V.40(6), p. 1680-1688, 2014.
- HSUEH, A.J.W. et al. Intraovarian control of early folliculogenesis. **Endocr. Rev.** v.36, p.1–24, 2015.
- JABŁOŃSKA-TRYPUĆ, A. et al. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. **J. Enzyme Inhib. Med. Chem.**, v.31, p. 177-183, 2016.
- JENSEN, A.K. et al. 86 successful births and 9 ongoing pregnancies worldwide in women transplanted with frozen-thawed ovarian tissue: focus on birth and perinatal outcome in 40 of these children, **J. Assist. Reprod. Genet.** V. 34(3), p. 325-336, 2016.
- JIA, Y. et al. Effect of optimized concentrations of basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor on proliferation of fibroblasts and expression of collagen: related to pericardial tissue regeneration. **Chinese Medical Journal**, v. 131(17), p. 20189-1096, 2018.

JIANG, K. et al. Barbaloin protects against lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury by inhibiting the ROS-mediated PI3K/AKT/NF- κ B pathway. **International Immunopharmacology**, v. 64, p. 140-150, 2018.

JOHNSON F; GIULIVI C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. **Mol Aspects Med.**, v. 26, p. 340-352, 2005.

KAMMEYER, A.; LUITEN, R.M. Oxidation events and skin aging. **Ageing Research Reviews**, v. 21, p. 16-29, 2014.

Kawamura, K. et al. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. **Proc. Natl. Acad.**, v.43, p. 17474–9, 2013

LEN, J.S. et al. The roles of reactive oxygen species and antioxidants in cryopreservation. **Bioscience Reports**, V.39(8), 2019.

LEONEL, E.C.R. et al. Stepped vitrification technique for human ovarian tissue cryopreservation. **Sci. Reprod.** V. 9, 2019.

LEYENS, G.; KNOOPS, B.; DONNAY, I. Expression of peroxiredoxins in bovine oocytes and embryos produced *in vitro*. **Molecular reproduction and development**, v. 69, p.243-51. 2004.

LIU, F. *et al.* Aloin Protects Skin Fibroblasts from Heat Stress-Induced Oxidative Stress Damage by Regulating the Oxidative Defense System. **PlosOne**, v. 10(12), 2015.

LOCATELLI, Y. et al. In vitro survival of follicles in prepubertal ewe ovarian cortex cryopreserved by slow freezing or non-equilibrium vitrification. **J. Assist. Reprod. Genet.** V. 36(9), p. 1823-1835, 2019.

MAIDARTI, M. et al. Inhibition of PTEN activates bovine non-growing follicles in vitro but increases DNA damage and reduces DNA repair response. **Human Reproduction**, V. 34(2), p. 297-307, 2019.

MARTINO N.A. et al. Vitrification preserves chromatin integrity, bioenergy potential and oxidative parameters in mouse embryos. **Reprod Biol Endocrinol**, v.11(27), 2013.

MASSIGNAM, E.T. et al. Antioxidant defense capacity of ovarian tissue after vitrification in a metal closed system. **JBRA Assist. Reprod.** V.22(3), P. 199-204, 2018.

MCLAUGHLIN, M. et al. Inhibition of phosphatase and tensin homologue (PTEN) in human ovary in vitro results in increased activation of primordial follicles but compromises development of growing follicles. **Mol. Hum. Reprod.** V.20(8), p. 736-744, 2014.

MOLL, G. et al. Do cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunomodulatory and therapeutic properties? **Stem Cells** v.32, p. 2430–2442, 2014.

MURAKAMI, M. et al., Perinatal outcomes for transfer of blastocysts vitrified and warmed in defined solutions with recombinant human albumin: 374 babies born after 898 embryo transfer. **J. Assist. Reprod. Genet.** V. 31, p. 1605-1610, 2014.

OHKAWARA, H. et al. Development of a vitrification method for preserving human myoblast cell sheets for myocardial regeneration therapy, **BMC Biotechnol.** V.18(1), 2018.

ROCHA, C.D. et al. Positive effect of resveratrol against preantral follicles degeneration after ovarian tissue vitrification, *Theriogenology*, v. 114, p. 244-251, 2018.

PROVENZANO, M. et al. The Association of Matrix Metalloproteinases with Chronic Kidney Disease and Peripheral Vascular Disease: A Light at the End of the Tunnel? **Biomolecules**, v.10(1), 2020.

SHI, Q. Vitrification versus slow freezing for human ovarian tissue cryopreservation: a systematic review and meta-analysis, **Sci. Rep.** v.7(1):8538, 2017.

SIGAROOD, F. et al. Aloe Vera/Collagen Mixture Induces Integrin $\alpha 1\beta 1$ and PECAM-1 Genes Expression in Human Adipose-Derived Stem Cells. **Adv. Pharm. Bull.** V.9(4), p. 662-667, 2019.

SILBER, S. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: scientific implications, **J. Assist. Reprod. Genet.** V.33, p.1595–1603, 2016.

TOYAMA-MORI, C. et al. Negative air pressure treatment accelerates the penetration of permeable cryoprotectants into bovine ovarian tissue in vitrification protocol and improves cell density after vitrification. **Cryobiology**, v. 88, p. 92-97, 2019.

TEPLICK, E. et al. The effects of Aloe vera on wound healing in cell proliferation, migration, and viability. **Wounds**, v.30(9), p. 263-268, 2018.

WOLK, B. Thermodynamic aspects of vitrification. **Cryobiology**, V.60, p. 11-22, 2010.

9. CONCLUSÕES GERAIS

- A presença de 10% e 50% de *Aloe vera* no meio de cultivo *in vitro* de folículos inclusos no tecido ovariano de bovinos permite ativação e desenvolvimento folicular, mantendo a morfologia saudável da célula e do tecido.
- A presença de *Aloe vera* na solução de vitrificação de tecido ovariano de bovinos melhora a qualidade geral do folículo e do tecido, reestabelecendo o desenvolvimento folicular após o cultivo *in vitro* do tecido vitrificado.
- A presença de *Aloe vera* na solução de vitrificação de tecido ovariano de bovinos aumenta a expressão de mRNA para *SOD*, *PRDX6* e *GPXI* no tecido após a vitrificação, pressupondo ação antioxidante do extrato.

10. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho poderão auxiliar na compreensão dos efeitos da adição do extrato de *Aloe vera* como suplemento em meios de cultivo *in vitro* e em solução de vitrificação de folículos inclusos no tecido ovariano de bovinos na morfologia, viabilidade, ativação e desenvolvimento folicular, bem como sobre a expressão de mRNA de enzimas antioxidantes. Tendo em vista a influência deletéria do estresse oxidativo no cultivo *in vitro* e na criopreservação de folículos ovarianos, a proteção celular e tecidual observada nesse estudo pode contribuir para fazer da *Aloe vera* uma importante aliada na melhoria de protocolos dessa natureza. Além disso, esse relatório poderá auxiliar na melhor compreensão da foliculogênese na espécie bovina. Investigações adicionais são necessárias para complementar os achados aqui relatados bem como para reduzir a escassez de estudos sobre o efeito da *Aloe vera* na dinâmica folicular e tecidual sob condições de cultivo *in vitro* e criopreservação.

REFERÊNCIAS

- ADONA P.R. et al. Review Article: Oogenesis and folliculogenesis in mammals. UNOPAR Científica. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v.15, n.3, p.245-50, 2012.
- AGUIAR, F.L.N. Cultivo *in vitro* de foliculos pré-antrais equinos inclusos em tecido ovariano: Benefícios da suplementação concentração-dependente da insulina, FSH e fator de crescimento epidermal. 2016. 202 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2016.
- AGUIAR, G.V. et al. Adição de *Aloe vera* ao diluente à base de água de coco em pó (ACP-101®) como crioprotetor do sêmen caprino resfriado a 4°C. In: **Congresso Norte Nordeste de Reprodução Animal Ciência Animal**, 6, Fortaleza, CE. Fortaleza, CE: CONERA, p.283-286, 2012.
- AIRES, V.A. et al. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin based extenders for cryopreservation of bovine semen. **Theriogenology**, v.60, p.269-279, 2003.
- ARAÚJO, R.A. et al. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, V. 12, 2014.
- ASADA, M.; FUKUI, Y. Effect on fertilization and development by re-culture after freezing and thawing of bovine oocytes matured in vitro. **Theriogenology**, v. 54 (6), p. 889-898, 2000.
- AYALA, A.; MUÑOZ, M.F.; ARGUELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, 2014.
- BAKKEN, A.M. et al. No differences in colony formation of peripheral blood stem cells frozen with 5% or 10% dimethyl sulfoxide. **J. Hematother Stem Cell Res.** V.12, p. 351-358, 2003.
- BARBOSA, K.B.F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, Campinas, v.23(4), p.629-643, 2010.
- BARBERINO, R.S. et al. Amburana cearensis leaf extract maintains survival and promotes in vitro development of ovine secondary follicles. **Zygote**, V.24(2), P. 277-285, 2015.
- BARBONI, B. et al. In vitro grown sheep preantral follicles yield oocytes with normal nuclear-epigenetic maturation. **Plos One.**, v. 6, n. 11. 2011.
- BEHMANESH, M.A. et al. Protective effect of *Aloe vera* extract against bisphenol A induced testicular toxicity in wistar rats. **Cell Journal (Yakhteh)**, V. 20(2), p.278-283, 2018
- BALA, S. et al. Protective role of Aloe vera against X-ray induced testicular dysfunction. **Andrologia**, v. 49(7), p. 1-16, 2016.
- BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.U.; SALES, J.N.S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31(2), p.205- 211, 2007.

BIASIBETTI-BRENDLER, H. et al. Hypoxanthine Induces Neuroenergetic Impairment and Cell Death in Striatum of Young Adult Wistar Rats. **Molecular Neurobiology**, v.55(5), p.4098-4106, 2018.

CASTRO, S.V. et al. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v 39(2), 2011.

CHOI, S.; CHUNG, M.H. A review on the relationship between *Aloe vera* components and their biologic effects. **Semin Integr Med**, 1(1):53-62, 2003.

DA CUNHA, E.V. et al. Effect of bone morphogenetic proteins 2 and 4 on survival and development of bovine secondary follicles cultured in vitro. **Theriogenology**, v. 110, p.44-51, 2018.

DAS, S. et al. Isolation and characterization of novel protein with anti-fungal and anti-inflammatory properties from Aloe vera leaf gel. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.48, p. 38-43, 2011.

DONFACK, N. J. In vivo and in vitro strategies to support caprine preantral follicle development after ovarian tissue vitrification. *Reproduction Fertility and Development*, **Reproduction, fertility and development**, V.30(8), p. 1055-1065, 2018.

DONG, F.L. et al. An research on the isolation methods of frozen-thawed human ovarian preantral follicles. **Int. J Clin. Exp Med**. V. 15(7), p. 2298-2303, 2014.

ELMOAZZEN, H.Y. Parameters affecting water permeability across biological cell membranes. 141p. Alberta, Canadá. Dissertation: University of Alberta, Faculty of Graduate Studies and Research, 2000.

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

ESTAKHR, J.; JAVDAN, N. Spermatogenic activit of Aloe vera in adult male rats. **Pharmacologyonline**, v. 2, p. 886-889, 2011.

FABBRI, R. Cryopreservation of human oocytes and ovarian tissue. **Cell Tissue Bank**, v.7, p.113-122, 2006.

FERREIRA, A.C.A. et al. Balance of insulin and FSH concentrations improves the in vitro development of isolated goat preantral follicles in medium containing GH. **Animal Reproduction Science**, v. 165, p. 1-10, 2016.

FIGUEIREDO, J.R; LIMA, L.F. Tecnologia do ovário artificial: aplicações, estado da arte, limitações e perspectivas. **Rev Bras Reprod Anim**, v.41, n.1, p.248-253 2017.

FIGUEIREDO, J.R. et al. Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais – MOIFOPA. In: GONÇALVES, P.B.D., FIGUEIREDO, J.R., FREITAS, V.J.F.

(Eds). Biotécnicas Aplicadas à Reprodução **Animal**. Editora **Roca**, São Paulo, p.303-327, 2008.

FIGUEIREDO, J.R; RODRIGUES, A.P.R; AMORIM, C.A. Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais – MOIFOPA. Biotécnicas Aplicadas á Reprodução Animal. **Ed. Varela**, São Paulo, p. 228 – 254. 2002.

FORTUNE, J.E; EPPIG, J.J. Efeitos das gonadotrofinas na secreção de esteróides por ovários de camundongos infantis e juvenis *in vitro*, **Endocrinologia**, V. 105, p. 760-768, 1979.

GANDOLFI, F. et al. Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: Comparative analysis between human and animal models. **Fertility Sterility**, v.85, p.1150– 1156, 2006.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. Sistema Reprodutor Feminino. In: GARTNER L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em Cores**, 3 ed., 576p. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007, p. 469-494.

GASTAL, G.D.A. et al. Effect of cryopreservation techniques on proliferation and apoptosis of cultured equine ovarian tissue. **Theriogenology**, v.126, p. 88-94, 2019.

GOSDEN R.G et al. Current perspective on primordial follicle cryopreservation and culture for reproductive medicine. **Hum Reprod Update**, v.8, p.105-110, 2002.

GOUGEON, A. Dynamics for human follicular growth: morphologic, dynamic, and functional aspects. In: LEUNG P. C. K.; ADASHI E. Y. (Eds.), **The ovary**, 2 ed., 664p. San Diego: Elsevier Academic Press, p.25-43, 2004.

GOUGEON, A.; BUSSO, D. Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary. **Mol Cell Endocrinol**, v.163, p.33-41, 2000.

GUERREIRO, D.D et al. In vitro study of Withanolide D toxicity on goat preantral follicles and its effects on the cell cycle. **Reproductive Toxicology**, v. 84, p. 18-25, 2019.

GUERREIRO, D.D *et al.* In situ cultured pré-antral follicles is a useful model to evaluate the effect of anticancer drugs on caprine folliculogenesis. **Microscopy Research and Technique**, v. 79(8), p. 773-781, 2016.

HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovary. **Int Rev Cytol.**, v.124, p.43-101, 1991.

HOVATTA O. Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. **RBM Online**, v.10, p.729-734, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE. Disponível em: <http://loja.ibge.gov.br/perfil-dos-municipios-brasileiros-2019.html>. Acesso em: 17.11.2019.

JAIN, K.J; PAULSON, R.J. Oocyte cryopreservation. **Fertility and Sterility**, v.86(3), p. 1037-1046, 2006.

JIMENEZ, C.R. et al. Sequential medium with GH and IGF-1 improved in vitro development of bovine preantral follicles enclosed in ovarian tissue. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53 (5), p. 1103-1113, 2018.

JIMENEZ, C.R. et al. The base medium affects ultrastructure and survival of bovine preantral follicles cultured in vitro. **Theriogenology**, v. 85(1), p. 1019-1029, 2016.

JULATON, V.T; REIJO PERA, R.A. NANOS3 function in human germ cell development *Hum. Mol. Genet.*, V.20, p. 2238-2250, 2011.

JUNQUEIRA, L.C.U; CARNEIRO, J. Histologia Básica. In: JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Aparelho Reprodutor Feminino**. 12. ed. Guanabara koogan, p. 427-447, 2013.

JYOTHI, K.; KALAYANI, D.; NACHIYAPPAN. Effect of acute exposure of N, N dimethyl formamide, an industrial solvent on lipid peroxidation and antioxidant in liver and kidney of rats. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v.49, p. 279–284, 2012.

KASHKA, R. H.; ZAVAREH, S.; LASHKARBOLOUKI, T. Augmenting effect of vitrification on lipid peroxidation in mouse preantral follicle during cultivation: Modulation by co-enzyme Q10. **Systems Biology In Reproductive Medicine**, [s.l.], v. 62, n. 6, p.404-414, 2016.

KEHLER, J. et al. Oct4 is required for primordial germ cell survival *EMBO Rep.*, V.5(11), p. 1078-1083, 2004.

KEROS, V. et al. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. **Human Reproduction**, v.24 (7), p. 1670-1683, 2009.

KLOCKE, S. et al. Slow-freezing versus vitrification for human ovarian tissue cryopreservation. **Gynecology and Obstetrics**, v.291, p. 419-426, 2015.

KNIGHT, P.G.; GLISTER, C. Potential regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. **Reproduction**, v. 121, p. 503-512, 2001.

LEE, S. et al. Comparison between slow freezing and vitrification for human ovarian tissue cryopreservation and xenotransplantation. **International Journal of molecular sciences**, V. 20(13), 2019.

LEE, H.N.; CHANG, E.M. Primordial follicle activation as new treatment for primary ovarian insufficiency. **Clinical and Experimental Reproductive Medicine**, v.46(2), p. 43-49, 2019.

LECCHI, L. et al. An update on methods for cryopreservation and thawing of hemopoietic stem cells. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 54, p. 324-336, 2016.

LEN, J.S. et al. The roles of reactive oxygen species and antioxidants in cryopreservation. **Bioscience Reports**, V.39(8), 2019.

LIMA, et al. Adaptation of the artificial ovary technology for wild animals. **Anais do IX Congresso Norte e Nordeste de Reprodução Animal (CONERA 2018)**, 2018.

- LIMA-VERDE, I. B.; ROSSETTO, R.; FIGUEIREDO, J. R. Influência dos hormônios esteroides na foliculogênese. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.35, n.4, p.472-482, out/dez. 2011.
- LINS, T.L.B.G. et al. Rutin can replace the use of three other antioxidants in the culture medium, maintaining the viability of sheep isolated secondary follicles. **Theriogenology**, v. 89, p. 263-270, 2017.
- LUCCI, C.M. et al. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. **Small Ruminant Research**, v. 41(1), p. 61-69, 2001.
- LUZ, H.K.M. et al. Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39(2), p. 956, 2011.
- MADRID GAVIRIA, S. et al., Resveratrol supplementation promotes recovery of lower oxidative metabolism after vitrification and warming of in vitro-produced bovine embryos. **Reprod. Fertil. Dev.** V. 31(3), p. 521-528, 2019.
- MAIDARTI, M. et al. Inhibition of PTEN activates bovine non-growing follicles in vitro but increases DNA damage and reduces DNA repair response. **Human Reproduction**, V. 34(2), p. 297-307, 2019.
- MARQUES, L.S. et al. Slow freezing versus vitrification for the cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) ovarian tissue. **Scientific Reports**, V.9, 2019.
- MARTINS, F. S. et al. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Rev Bras Reprod Anim.**, v.32, n.1, p.36-49, jan./mar. 2008.
- MBEMYA, G.T. et al. Supplementation of in vitro culture medium with FSH to grow follicles and mature oocytes can be replaced by extracts of *Justicia insularis*. **Plos One**, v.13 (12): e0208760, 2018.
- MCLAUGHLIN, M. et al. Activin promotes follicular integrity and oogenesis in cultured preantral bovine follicles. **Hum. Reprod.**, v. 16, p. 644-53, 2010.
- MOLINARO, E.M. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: v. 2 / Organização de Etelcia Moraes Molinaro, Luzia Fátima Gonçalves Caouto e Maria Regina Reis Amendoeira. – Rio de Janeiro: EOSJV; IOC, 2010.
- MONNIAUX, D. et al. The ovarian reserve of primordial follicles and the dynamic reserve of antral growing follicles: what is the link? **Biology of reproduction**, V.90(4), p. 1-11, 2014.
- MAIDARTI, M. et al. Inhibition of PTEN activates bovine non-growing follicles in vitro but increases DNA damage and reduces DNA repair response. **Human Reproduction**, V. 34(2), p. 297-307, 2019.
- NASCIMENTO, T.S. et al., Effect of red propolis extract isolated or encapsulated in nanoparticles on the in vitro culture of sheep pré-antral follicles: impacts on antrum formation, mitochondrial activity and glutathione levels. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54 (1), p. 31-38, 2018.

OHINATA, Y. et al. Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. **Nature**, V. 436, p. 207-213, 2005.

OLIVEIRA, S. C.; SARAPIÃO, V. R.; QUINTÃO, C. C. R. **Biotécnicas em reprodução animal**. Juiz de Fora, MG: Embrapa gado de leite, 2014.

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

OKTAY, K. et al. Fertility preservation in patients with câncer: ASCO clinical practice guideline update. **J Clin. Oncol**, V. 36, p.1994-2001, 2018.

OZSOY, N.; CANDOKEN, E.; AKEV, N. Antioxidative activity, total phenols, flavonoids, ascorbic acid, β -carotene and α -tocopherol in *Aloe vera*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, V.2(2), p. 99-106, 2009.

PAES, V.M. et al. Effect of heat stress on the survival and development of *in vitro* cultured bovine preantral follicles and on *in vitro* maturation of cumulus-oocyte complex. **Theriogenology**, v. 86(4), p. 994-1003, 2016.

PANDEY, A.; SINGH, S. Aloe Vera: A Systematic Review of its Industrial and Ethno-Medicinal Efficacy. **International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences**, v.5, n.1, p.21-33, 2016.

PEGG, D.E. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols Methods. Molecular Biology. 2nd edn. Totowa: **Humana Press Inc.**, 348p, 2007.

PESCE, M.; KLINGER, F.G.; FELICI, M. Derivation in culture of primordial germ cells from cells of the mouse epiblast: phenotypic induction and growth control by Bmp4 signaling. **Mechanisms of development**, V.112, p. 15-24, 2002.

PLAZAS, D.C.S. Efeito dos extratos de *Spirulina Maxima* e *Kefir* no cultivo de folículos pré-antrais de suino. (Dissertação) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2015.

PORRAS-GÓMEZ, T.J; MORENO-MENDOZA, N. Neo-oogenesis in mammals. **Zygote**, V. 25(4), p. 404-422, 2017.

RADHA, M.H.; LAXMIPRIYA, N. Evaluation of biological properties and clinical effectiveness of *Aloe vera*: A systematic review. **Journal of traditional and complementary medicine**, V.5(1), p. 21-26, 2015.

RAJABI-TOUSTANI, R. et al. Effect of Papaver rhoeas L. extract on *in vitro* maturation of sheep oocytes. **Small Rumin Res**. 114:146 – 51, 2013.

RAMESH, A. et al. Ovarian susceptibility to benzo[a]pyrene: tissue burden of metabolites and dna adducts in f-344 rats. **J. Toxicol. Environ. Health A**. v. 73 (23), p. 1611-1625, 2010.

- ROCHA, C.D. et al. Positive effect of resveratrol against preantral follicles degeneration after ovarian tissue vitrification. **Theriogenology**, V.114, p. 244-251, 2018.
- RODRIGUES, A.P.R. et al. Advances in ovarian tissue cryopreservation in goats and sheep. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.8(2), p. 284-291, 2014.
- RODRIGUES, A.P.R. et al. Associação das técnicas de criopreservação e cultivo in vitro de folículos pré-antrais para a obtenção de embriões caprinos. **Ciência Animal**, v. 22(1): p.42-54, 2012.
- RODRIGUES, G.Q. et al. Bovine serum albumin improves in vitro development of caprine preantral follicles. **Anim. Reprod.**, v.7, n.4, p.382-388, 2010.
- ROSSETTO R. et al. Effect of medium composition on the in vitro culture of bovine preantral follicles: morphology and viability do not guarantee functionality. **Zygote**, v. 21, p.125–128, 2013.
- ROSSETTO, R. et al. Avanços no isolamento e sistemas de cultivo de folículos pré-antrais. **Acta Veterinária Brasileira**, v.5, n.1, p.15-23, 2011.
- SAADIA, S. et al. Recent advances in food biopeptides: Production, biological functionalities and therapeutic applications. **Biotechnology Advances**. V. 33 (1), p.80–116, 2015.
- SAEED-ZIDANE, M. et al. Cellular and exosome mediated molecular defense mechanism in bovine granulosa cells exposed to oxidative stress. **PLoS One**, v. 12 (11), 2017.
- SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, V. 1822(12), p. 1896-1912, 2012.
- SANCHES, B.V. Uso de propanediol ou DMSO na vitrificação de embriões bovinos produzidos in vitro, cultivados ou não na presença de Forskolin. Dissertação, Universidade federal de Goiás. 49f. Goiânia, GO. 129p. Dissertação (Mestrado em ciência veterinária). Programa de pós-graduação em ciência animal, Escola de veterinária da Universidade Federal de Goiás, 2009.
- SÁNCHEZ-MACHADO, D.I. et al. *Aloe vera*: Ancient knowledge with new frontiers. **Trends Food Sci. Technol.**, V.61, p. 94–102, 2017.
- SANTOS, R.R. et al. Cryopreservation of ovarian tissue: An emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. **Ani Reprod Sci**, v.122, p.151-163, 2010.
- SANTOS, R.R. et al. Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. **Rev Bras Reprod Anim**, v.32, p.9-15, 2008.
- SANTOS, R.R. et al. Histological and ultrastructural analysis of cryopreserved sheep preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v.91, p. 249-263, 2006.

SENGER, P.L. Pathways to Pregnancy and Parturition. 2nd Ed. Washington: Current Conceptions Inc., p. 368, 2003.

SHAHRAKI A.; SHAHKARI MOJAHED A.; AFSHAR-GOLI J. The effects of hydroalcoholic extract of Aloe vera gel on spermatogenesis of adult male rats. **Int J Biosci**, v.5(7), p. 158-165, 2014.

SHAW, J.M.; WOOD, E.C.; TROUNSON, A.O. Cryopreservation of oocyte and embryo. In: Trounson A, Gardner D. **Handbook of In vitro fertilization**. 2 ed. Florida: CRC Press, p.376-380, 2000.

SHEA, L. D.; WOODRUFF, T.K.; SHIKANOV, A. Bioengineering the ovarian follicle microenvironment. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v.16, p. 29–52, 2014.

SHEIKHI, M. et al. Clinical grade vitrification of human ovarian tissue: an ultrastructural analysis of follicles and stroma in vitrified tissue. **Human Reproduction**, v.26(3), p.594-603, 2011.

SILVA, B.R. et al. Dose-dependent effects of frutalin on in vitro maturation and fertilization of pig oocytes. **Animal Reproduction Science**, V. 192, p. 216-222, 2018.

SMAGUR, A. et al. Impact of different dimethyl sulphoxide concentrations on cell recovery, viability and clonogenic potential of cryopreserved peripheral blood hematopoietic stem and progenitor cells. **Vox Sang**. V. 104, p. 240-247, 2013.

SMITZ, J.E.J.; CORTVRINDT, R.G. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. **Reproduction**, v.123, p.185-202, 2002.

SOARES-COSTA, M.A.A. et al. Effects of frutalin and doxorubicin on growth, ultrastructure and gene expression in goat secondary follicles cultured in vitro. **Research in Veterinary Science**, V.120, p. 33-40, 2018.

SOUZA, A.L.P. et al. Use of Aloe vera-based extender for chilling and freezing collared pecary (*Pecari tajacu*) semen. **Theriogenology**, v. 859(8), p. 1432–1438, 2016.

SOYAL, S.H.; AMLEH, A.; DEAN, J. FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. **Development**, V.127, p. 4645-4654, 2000.

SUMI, F.A. et al. Phenolic content analysis of *aloe vera* gel and evaluation of the effect of aloe gel supplementation on oxidative stress and fibrosis in isoprenaline-administered cardiac damage in rats. **Preventive Nutrition and Food Science**, V. 24(3), p. 254-264, 2019.

SURJUSHE, A; VASANI, R.; SAPLE, D.G. *Aloe vera*: a short review. **Indian J Dermatol**, v.53(4), p.163-166, 2008.

TELFER, E.E. et al. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. **Hum. Reprod**. V.23, p. 1151-1158, 2008.

TSUDA, M. et al. Conserved role of nanos proteins in germ cell development. **Science**, V.301, p. 1239-1241, 2003.

WESTPHAL, J.R. et al. Complete protection against cryodamage of cryopreserved whole bovine and human ovaries using DMSO as a cryoprotectant. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, V. 34(9), p. 1217-1229, 2017.

WOWK, B. Thermodynamic aspects of vitrification. **Cryobiology**, v.60(1), p. 11-22, 2010.

WUSTEMAN, M. et al. Reduction of cryoprotectant toxicity in cell in suspension by use of a sodium-free vehicle solution. **Cryobiology**, V.56, p. 72-29, 2008.

YAMAGUCHI, S. et al. Conditional knockdown of Nanog induces apoptotic cell death in mouse migrating primordial germ cells. **Development**, V.136, p. 4011-4020, 2009.

YAMAJI, M. et al. Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. **Nat. Genet.**, V.40, p. 1016-1022, 2008.

YAMAKI, S.B.; PEDROSO, A.G.; ATVARIS, T.D.Z. O estado vítreo dentro da perspectiva do curso de graduação em química (físicoquímica). **Química Nova**, v.25, p.330-334, 2002.

YOUNGREN, K.K et al. The Ter mutation in the dead end gene causes germ cell loss and testicular germ cell tumours. **Nature**, V. 435, p. 360-364, 2005.

ZHMAKIN, A.I. Physical aspects of cryobiology. **Uspekhi Fizicheskikh Nauk**. V.178, p. 243-266, 2008.