



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

VENÂNCIA ANTONIA NUNES AZEVEDO

**EFEITO DO EXTRATO DE *ALOE VERA* NO CRESCIMENTO, VIABILIDADE E NA
EXPRESSÃO GÊNICA DE FOLÍCULOS SECUNDÁRIOS BOVINOS CULTIVADOS
IN VITRO**

SOBRAL - CE
2021

VENÂNCIA ANTONIA NUNES AZEVEDO

EFEITO DO EXTRATO DE *ALOE VERA* NO CRESCIMENTO, VIABILIDADE E NA
EXPRESSÃO GÊNICA DE FOLÍCULOS SECUNDÁRIOS BOVINOS CULTIVADOS
IN VITRO

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 - CE

2021

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)

A986e Azevedo, Venância Antonia Nunes.

EFEITO DO EXTRATO DE ALOE VERA NO CRESCIMENTO, VIABILIDADE E NA EXPRESSÃO GÊNICA DE FOLÍCULOS SECUNDÁRIOS BOVINOS CULTIVADOS IN VITRO / Venância Antonia Nunes Azevedo. – 2021.

102 f.: il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2021.

Orientação: Prof. Dr. Ana Liza Paz Souza Batista.

1. Crescimento folicular. 2. Aloe vera. 3. Foliculogênese. 4. Vaca. I. Título.

CDD 660.6

VENÂNCIA ANTONIA NUNES AZEVEDO

EFEITO DO EXTRATO DE *ALOE VERA* NO CRESCIMENTO, VIABILIDADE E NA EXPRESSÃO GÊNICA DE FOLÍCULOS SECUNDÁRIOS BOVINOS CULTIVADOS
IN VITRO

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

Aprovado em: 18/05/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Ana Liza Paz Souza Batista (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)
Faculdade Cisne de Quixadá

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
UNINTA - Sobral

*Dedico,
A minha amada mãe, Lena Nunes*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela fortaleza, equilíbrio, coragem e sabedoria para enfrentar os obstáculos durante a minha caminhada. Gratidão por cuidar tão bem de mim.

À minha família, pela compreensão, incentivo, amor e carinho. Em especial à minha mãe Lena, pelos cuidados, incentivos e pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

A uma pessoa muito querida e especial, Felipe Barreto, por sempre estar ao meu lado diante de todas as circunstâncias da vida e pela paciência diária para comigo.

À minha orientadora, professora Dra. Ana Liza, pelos ensinamentos, paciência, solicitude, confiança e amizade durante essa jornada. Gratidão por me orientar com tamanha maestria e por ser um exemplo de orientadora.

Ao professor Dr. José Roberto, pela oportunidade de ingressar no grupo de pesquisa, pela confiança depositada, paciência e pelos ensinamentos durante a minha formação. Por ser um profissional exemplar.

Ao professor Dr. Anderson Weiny, pelos ensinamentos, apoio, confiança e boa vontade em ajudar sempre. Por ser um profissional que inspira.

Aos pesquisadores e colegas do Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia Reprodutiva e do Núcleo de Experimentação Animal, Erlândia Vasconcelos, Pedro Alves, Igo Teixeira, Francisco Costa, Mônica Dias, Laís Paulino, Bianca Silva, Alana Nogueira, Amanda Gomes e Jordânia Marques. Obrigada pela valiosa colaboração nas pesquisas e pela amizade durante esse ciclo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de mestrado.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelo apoio financeiro para a realização 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.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito de diferentes concentrações do extrato de *Aloe vera* no crescimento, morfologia, viabilidade, formação de antro e os níveis RNAm para *SOD*, *CAT*, *GPXI* e *PRDX6* em folículos secundários bovinos cultivados in vitro. Para isso, oosovários de vacas multíparas foram obtidos em um abatedouro local. No laboratório, o córtex ovariano foi fragmentando e os folículos secundários (150 a 250µm) foram isolados e cultivados individualmente a 38,5°C, CO₂ a 5%, por 18 dias em meio controle constituído pelo TCM-199 suplementado com BSA, insulina, transferrina, selênio, FSH, penicilina e estreptomina, ácido ascórbico, glutamina e hipoxantina. Os tratamentos consistiram da adição de 2,5, 5, 10 ou 20% do extrato de *Aloe vera* ao meio de cultivo. A cada 6 dias, avaliou-se o crescimento folicular (diâmetro e crescimento diário), a morfologia e a formação do antro. Ao final do cultivo, a viabilidade folicular (fluorescência com calceína/etídeo) e a expressão de transcritos para enzimas antioxidantes *SOD*, *CAT*, *GPXI* e *PRDX6*, por PCR em tempo real, foram avaliadas. Os dados referentes ao crescimento folicular e da taxa de crescimento diária foram submetidos ao teste de Kolmogorov- Smirnov, seguido do teste Kruskal-Wallis. Para analisar a sobrevivência e formação de antro foi utilizado o teste Qui-quadrado. O teste t de Student foi utilizado para avaliar os níveis de intensidade luminosa para Calceína- AM e Homodímero-etídeo. Os níveis de mRNA foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste post hoc não paramétrico. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. Os resultados mostraram que o *Aloe vera* manteve a morfologia folicular semelhante ao grupo controle. Os folículos cultivados na presença de *Aloe vera* apresentaram um aumento progressivo do diâmetro folicular até o dia 12 de cultivo. Um aumento na taxa de crescimento diário foi observado do dia 0 ao dia 6 no tratamento com 5% de *Aloe vera* quando comparado ao grupo de controle. Folículos cultivados com 2,5% de *Aloe vera* tiveram maior taxa de formação de antro do que aqueles cultivados no grupo controle. Quanto à viabilidade, folículos cultivados com 2,5 e 5% de *Aloe vera* apresentaram maior taxa de viabilidade do que folículos cultivados em meio controle. A presença de 2,5, 5 e 20% de *Aloe vera* no meio de cultura manteve os níveis de mRNA para *SOD*, *CAT* e *PRDX6* nos folículos semelhantes ao grupo controle. Em conclusão, a *Aloe vera* mantém a morfologia de folículos secundários cultivados in vitro por 18 dias, sendo que 2,5% de *Aloe vera* promove a formação de antro, aumenta a viabilidade folicular e mantém a expressão de mRNA para *SOD* e *PRDX6* após o cultivo.

Palavras- chave: Crescimento folicular. *Aloe vera*. Foliculogênese. Vaca.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effect of different concentrations of *Aloe vera* extract on growth, morphology, viability, antrum formation and mRNA levels for *SOD*, *CAT*, *GPX1* and *PRDX6* in vitro cultured bovine secondary follicles. For this, the ovaries of multiparous cows were obtained from a local slaughterhouse. In the laboratory, the ovarian cortex was fragmented, and the secondary follicles (150 to 250µm) were isolated and cultured individually at 38.5°C, CO₂ at 5%, for 18 days in a control medium consisting of TCM-199 supplemented with BSA, insulin, transferrin, selenium, FSH, penicillin and streptomycin, ascorbic acid, glutamine and hypoxanthine. The treatments consisted of adding 2.5, 5.0, 10.0 or 20.0% of the *Aloe vera* extract to the culture medium. Every 6 days, Follicular growth (diameter and daily growth), morphology and antrum formation was evaluated. At the end of the culture, follicular viability (fluorescence with calcein / ethidium), and the expression of transcripts for antioxidant enzymes *SOD*, *CAT*, *GPX1* and *PRDX6*, by real-time PCR, were evaluated. Data on follicular growth and daily growth rate were submitted to the Kolmogorov-Smirnov test, followed by the Kruskal-Wallis test. To analyze survival and antrum formation, the Chi-square test was used. The Student's t-test was used to assess the levels of luminous intensity for Calceina-AM and homodimer- ethidium. The mRNA levels were analyzed by the Kruskal-Wallis test. Differences were considered significant when $P < 0.05$. The results showed that *Aloe vera* maintained follicular morphology similar to the control group. Follicles cultured the presence of *Aloe vera* showed a progressive increase in follicular diameter until the 12 day of culture. An increase in daily growth rate was observed from day 0 to day 6 in treatment with 5.0% *Aloe vera* when compared to the control group. Follicles cultured with 2.5% *Aloe vera* had higher rate of antrum formation than those cultured in the control group. Regarding viability, follicles cultured with 2.5 and 5.0% *Aloe vera* showed a higher viability rate than follicles cultured in control medium. The presence of 2.5, 5.0 and 20.0% *Aloe vera* in the culture medium maintained the levels of mRNA for *SOD*, *CAT* and *PRDX6* in follicles similar to the control group. In conclusion, *Aloe vera* maintains the morphology of secondary follicles cultured in vitro for 18 days, and 2.5% of *Aloe vera* promotes antrum formation, increases follicular viability and maintains mRNA expression for *SOD* and *PRDX6* after cultivation.

Key-words: Follicular growth. *Aloe vera*. Folliculogenesis. Cow.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

	Comunicação	celular	por	vesículas	
FIGURA 1	extracelulares.	Fonte:	Modificado	de	CLARKE
	(2018).....				24
FIGURA 2	Esquema ilustrativo da via de sinalização Nrf2/Keap1. Fonte: HAHN; OLIVEIRA;BOCK (2017).....				30
FIGURA 3	Mecanismos de ação subjacentes às propriedades farmacológicas da <i>Aloe vera</i> . Fonte: Adaptado de KUMAR et al (2019).....				37

CAPÍTULO 2

FIGURE 1

Follicular growth after 18 days of culture. (A-D) Secondary follicles individually cultured in TCM-199⁺ alone; (E-H) or with 2.5 % *Aloe vera* extract (AV); (I - L) 5.0% AV; (M - P) 10.0% AV or (Q - T) 20.0% AV. Oocyte (dash circles), antrum formation (*), intact basement membrane (arrows) and granulose cells (cg). Scale bar=100µm for follicle.....72

FIGURE 2

Fluorescence intensity of the calcein AM (green) and ethidium homodimer (red) in bovine secondary follicle after 18 days of in vitro cultured in TCM- 199⁺ alone or supplemented with different concentrations *Aloe vera* (AV) extract (2.5, 5.0, 10 or 20.0% AV). Significantly different ($P < 0.05$). *represent differences between treatments ($P < 0,05$). ^{A, B} Lower case letters represent statistically significant differences between treatments for the fluorescence intensity of calcein-AM; ^{a,b} Capital letters represent statistically significant differences between treatment for the fluorescence intensity of ethidium homodimer-1; *represent differences between treatments for the the fluorescence intensity between calcein-AM and ethidium homodimer-1 ($P < 0,05$).....73

FIGURE 3

Viability of bovine secondary follicles after in vitro culture for 18 days after staining with calcein-AM (green) and ethidium homodimer-1 (red). Secondary follicles were cultured in TCM-199⁺ alone (A,B) or supplemented with 2.5% (C,D), 5.0% (E,F), 10.0% (G,H) or 20.0% (I, J) *Aloe vera* extract (AV). The scale bars represent 100µm.....74

FIGURE 4

Levels of mRNA (means \pm standard deviation (SD)) for (A) SOD, (B) CAT, (C) PRDX6 or (D) GPX1 in secondary follicles cultured in vitro for 18 days in TCM 199+ alone or supplemented with 2.5, 5.0, 10.0 or 20.0% *Aloe vera* extract (AV). ^{a,b,c} Lowercase letters represent statistically significant differences between treatments (P<0.05)..... 75

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

TABELA 1. Cronologia da foliculogênese em bovinos e caracterização folicular.
Fonte: Autor21

TABELA 2. Substâncias associadas ao meio base de cultivo para folículos pré-antrais bovinos isolados. Fonte: Autor..... 29

TABELA 3. Principais componentes bioativos do extrato de *Aloe vera*. Fonte:RAHMAN;
CARTER AND BHATTARAI. (2017), DARZI et al. (2021).....38

CAPÍTULO 2

TABLE 1. Primer pairs used for real-time PCR..... 69

TABLE 2. Diameters and daily growth (mean \pm standard error of the mean (SEM)) of bovine secondary follicles after 0, 6, 12 and 18 days of in vitro culture in TCM-199⁺ alone or supplemented with 2.5, 5.0, 10.0 or 20.0% *Aloe vera* extract (AV) (P<0.05).....70

TABLE 3. Daily growth (mean \pm standard error of the mean (SEM)) of morphologically normal bovine secondary follicles in vitro cultured in TCM-199⁺ alone or supplemented with 2.5, 5.0, 10.0 or 20.0% *Aloe vera* extract (AV)74

TABLE 4. Percentages of morphologically normal secondary follicles and of antrum formation after 18 days of in vitro culture in TCM-199⁺ alone or supplemented with 2.5, 5.0, 10.0 or 20.0% *Aloe vera* extract (AV), (P<0.05)74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aiPLA	Fosfolipase A2 independente de cálcio e ácido
ARE	Elemento de Resposta Antioxidante
ATP	Adenosina trifosfato
AV	<i>Aloe vera</i>
ANOVA	Análise de Variância
BMP-4	Proteína Morfogenética Óssea 4
BMP-15	Proteína Morfogenética Óssea 15
BSA	Albumina Sérica Bovina
CAT	Catalase
CCNB1	Ciclina B1
CC	Células do cumulus
CG	Células da granulosa
CT	Células da teca
CGP	Células germinativas primordiais
cMOS	Fator de Maturação de Oócitos MOS
Cu/ZnSOD	Superóxido dismutase dependente de manganês
Cul3-Rbx1	E3-ubiquitin ligase complex/Ring box protein
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Ec-SOD	Superóxido dismutase extracelular
EGF	Fator de crescimento epidermal
EO	Estresse oxidativo
EpRE	Elemento de resposta eletrofílica
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FF	Fluido folicular
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GDF-9	Fator de diferenciação 9
GPX1	Glutaciona Peroxidase 1
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona
IL-1	Interleucina 1
IL-1 β	Interleucina 1 β
LH	Hormônio luteinizante
LPCAT	Lisofosfatidilcolina acil transferase
miRNAs	MicroRNAs
McCoy	Meio base de McCoy
MOIFOPA	Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais
Mn-SOD	Superóxido dismutase dependente de manganês
mRNA	RNA mensageiro
Nfr2	Fator Nuclear Eritroide 2 Relacionado ao Fator 2
PBS	Phosphatebuffered saline (Tampão fosfato salino)
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PRDX6	Perocirredoxina 6
PRDX	Peroxirredoxina
RNA	Ácido ribonucléico
TCM-199	Meio de cultivo tecidual
TCM-199 ⁺	Meio de Cultivo Tecidual Suplementado
TNF α	Fator de Necrose Tumoral
TXN	Tioredoxina
VE	Vesícula extracelular
α - MEM	Meio essencial mínimo alfa

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
©	Copyright
®	Marca Registrada
Cm	Centímetro
Nm	Nanometro
PM	Petametro
μ g	Micrograma
μ l	Microlitro
μ m	Micrometro
M	Molar
G	Gramas
Mg	Miligrama
mM	Milimolar
mL	Mililitros
Ng	Nanogram
°C	Grau Celsius
<	Menor que
α	Alfa
β	Beta
H	Hora
Min	Minuto
S	Segundos
Mm	Milímetro
O ₂	Oxigênio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
OH	Hidroxila
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
CO ₂	Dióxido de carbono

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1. Oogênese e foliculogênese	20
2.2. Comunicação celular durante o desenvolvimento folicular.....	24
2.3. Isolamento folicular.....	26
2.4. Cultivo in vitro de folículos pré-antrais.....	27
2.4.1. Meio de cultivo in vitro para folículos pré antrais	28
2.5. Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo	30
2.6. Antioxidantes	33
2.6.1. Mecanismo de ação das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPX1 e PRDX6 no ováriumamífero.....	34
2.6.2. Antioxidantes naturais.....	35
2.7. Aloe vera.....	36
3. JUSTIFICATIVA	40
4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS	41
5. OBJETIVOS	42
5.1. Objetivo geral.....	42
5.2. Objetivos específicos	42
6. CAPÍTULO 1: The use of plant extracts in the development of culture medium to in vitro growth of follicles, oocytes and embryos from different species.....	43
7. CAPÍTULO 2: Effects of Aloe vera on growth, viability and gene expression in bovine secondary follicles cultured in vitro.....	64
8. CONCLUSÕES GERAIS	84
9. PERSPECTIVAS	85
REFERÊNCIAS.....	86

1. INTRODUÇÃO

A utilização de biotécnicas ligadas à reprodução animal são ferramentas essenciais para aumentar os índices reprodutivos de diferentes rebanhos, como os de bovinos gerando impactos significativos para a economia mundial, atuando como fonte de renda para criadores, além de produzir alimento de alto valor nutricional (SANTOS et al., 2012). Dentre as biotécnicas, a Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Pré-antrais (MOIFOPA) tem se tornado promissora, dado o potencial em maximizar o uso de folículos pré-antrais (FOPAs) (CANDENAS et al., 2018). Desse modo pode contribuir na multiplicação de animais geneticamente superiores, na elucidação dos mecanismos envolvidos na regulação da foliculogênese inicial ainda pouco compreendida, e para restaurar ou preservar a função reprodutiva de mulheres que enfrentam problemas de infertilidade (FIGUEIREDO et al., 2019, ANTONINO et al., 2019). Através desta técnica, é possível resgatar FOPAs do ambiente ovariano e cultivar in vitro até a sua maturação evitando assim, a morte folicular que ocorreria in vivo (ARAUJO et al., 2014). Contudo, apesar do amplo desenvolvimento já alcançado, sistemas de cultivo in vitro ainda enfrentam desafios. Um dos entraves para o sucesso dessa técnica é o estresse oxidativo (EO) induzido pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS) e depleção do sistema antioxidante (ANDRADE et al., 2019).

A produção de EROS durante o cultivo in vitro de folículos pré-antrais está relacionada a algumas variáveis como, a exposição a concentrações de oxigênio superiores às fisiológicas (20%), exposição aos comprimentos de onda de luz, excesso de manipulação, substâncias que compõe o meio de cultivo e ausência da proteção antioxidante materna, que podem afetar o desenvolvimento folicular e limitar o sucesso do cultivo (SOVERNIGO et al., 2017, VON MENGDEN et al., 2020). Todos estes fatores podem comprometer o sistema de defesa antioxidante da célula, através da inativação de enzimas antioxidantes, como glutathione peroxidase (GPX), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e peroxirredoxinas (PRDX) (MORAIS et al., 2019). Além disso induz a peroxidação lipídica danos mitocondriais, a membrana plasmática, ao DNA, e a oxidação de proteínas, carboidratos e lipídios, resultando em diminuição da qualidade oocitária e dos embriões produzidos (LINS et al., 2017).

Desse modo, os meios de cultivo necessitam ser suplementados com antioxidantes que possam contrabalancear os efeitos induzidos pelas EROS a fim de aumentar a eficiência

do cultivo (KHAN et al., 2018). Os antioxidantes são moléculas estáveis que impedem a oxidação de outros compostos (HES et al., 2019). Atuam doando um elétron a um radical livre carregado e finaliza a reação em cadeia antes que as moléculas vitais sejam comprometidas (KUMAR et al., 2017). Além disso, agem na remoção de biomoléculas danificadas e na reconstituição das estruturas biológicas lesionadas (PISOSCHI E POP, 2015). Assim, considerando a importância dos agentes antioxidantes, a utilização de novas substâncias, em especial àquelas de origem natural, que sejam capazes de atenuar os danos causados pelas EROS durante o cultivo apresenta-se como uma alternativa promissora.

Neste sentido, o extrato vegetal da *Aloe vera*, que possui vastas propriedades farmacológicas, como antioxidante apresenta-se como potencial substância a ser adicionada ao meio de cultivo de folículos pré-antrais bovinos. A atividade antioxidante da *Aloe vera* é atribuída à sinergia diferentes compostos fenólicos, como catequina, ácido sinápico, quercitrina, ácido genticóico, carotenóides, α -tocoferol, epicatequina e flavonóides presentes no gel mucilaginoso (RADHA E LAXMIPRIYA, 2015; HES et al., 2019). Estudos in vitro já relataram a eficiência do extrato de *Aloe vera* na eliminação de vários radicais livres (CESAR et al., 2018). Haritha et al. (2014), demonstraram que o extrato de *Aloe vera* pode reduzir EROS altamente reativas que causam danos extensivos aos lipídios da membrana celular de espermatozoides (BEHMANESH et al., 2018). Uma investigação recente demonstrou que o extrato de *Aloe vera* regulou positivamente a expressão das enzimas SOD2 e CAT em células epiteliais da córnea humana (CEVAROLO et al., 2021). Sumi et al. (2019) demonstraram que o gel *Aloe vera* aumentou a atividade de enzimas antioxidantes, como CAT e SOD, além de aumentar o GSH no tecido cardíaco de ratos. Simultaneamente, uma diminuição significativa do malondialdeído (MDA) também foi observada. Nossa equipe relatou que a adição do extrato de *Aloe vera* no meio de cultivo in vitro de tecido ovariano bovino, aumentou a expressão da enzima antioxidante PRDX6, melhorou a integridade morfológica dos folículos pré-antrais, induziu a ativação e o desenvolvimento folicular, bem como manteve os níveis de colágeno no tecido (COSTA, 2020). Entretanto, os efeitos da *Aloe vera* sobre o desenvolvimento folicular após cultivo in vitro de folículos pré-antrais isolados bovinos ainda não são conhecidos.

Nesse contexto, tendo em vista que os extratos vegetais possuem inúmeras moléculas bioativas na sua composição que podem influenciar as funções celulares, a compreensão acerca do potencial de ação do extrato de *Aloe vera* no controle do estresse oxidativo em folículos cultivados in vitro poderá expandir uma perspectiva de sua utilização, como

suplemento ao meio de cultivo de folículos ovarianos isolados. Para um melhor esclarecimento à cerca da relevância desta proposta, a seguir serão abordados aspectos relacionados: (1) oogênese e foliculogênese, (2) comunicação celular durante o desenvolvimento folicular, (3) manipulação de folículos pré- antrais, (4) espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo, (5) antioxidantes, (6) *Aloevera*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Oogênese e foliculogênese

O processo de oogênese consiste na formação e diferenciação das células germinativas primordiais (CGP), culminando com a formação do oócito haplóide fecundado (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Este processo biológico ocorre de forma sincrônica ao da foliculogênese, dado pelo crescimento e maturação dos folículos, estes processos iniciam-se ainda durante a vida fetal na maioria das espécies, incluindo primatas e ruminantes (MCLAUGHLIN et al., 2010).

Em mamíferos, ao final do primeiro mês de desenvolvimento embrionário, CGP migram das paredes do saco vitelínico até os primórdios gonadais, sofrendo extensiva proliferação mitogênica e redistribuição das organelas citoplasmáticas, transformando-se em oogônias, as quais são envolvidas por uma camada de células somáticas, consideradas precursoras das células da granulosa (HIRSHFIELD, 1991, OKTEM E OKTAY, 2008). 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. As oogônias proliferam-se por mitose, entrando em seguida em meiose e, então, diferenciam-se em oócitos primários que são envolvidos por uma camada de células da granulosa achatadas (folículos primordiais), os quais passam pelos estágios da prófase I (leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno) da primeira divisão meiótica por volta do terceiro mês. No estágio de diplóteno ou vesícula germinativa, ocorre a primeira interrupção da divisão meiótica e os oócitos permanecem neste estágio até a puberdade (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2013).

Com o pico do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH) durante a puberdade, ocorre a retomada da meiose, onde os oócitos crescidos e o núcleo passam do estágio de vesícula germinativa para diacinese. Logo em seguida, ocorre a ruptura da vesícula germinativa, progressão para metáfase I, anáfase I, telófase I, expulsão do primeiro corpúsculo polar e assim, a formação do oócito secundário que marca o início da segunda divisão meiótica. Nessa etapa, o núcleo do oócito evolui até alcançar o estágio

de metáfase II, entrando na segunda interrupção meiótica (SÁNCHEZ E SMITZ, 2012). O oócito permanece neste estágio até ser fecundado pelo espermatozoide, onde vai completar a meiose e expulsar o segundo corpúsculo polar, formando o oócito haploide fecundado (VAN DEN HURK E ZHAO, 2005).

A foliculogênese é o processo fisiológico de desenvolvimento folicular (FIGUEIREDO et al., 2018). Em sua fase inicial compreende as etapas de ativação, crescimento e maturação folicular, inicia com a ativação dos folículos primordiais e continua com o crescimento de folículos primários, secundários e antrais, culminando em um folículo totalmente maduro (FIGUEIREDO et al., 2019; JONES E SHIKANOV, 2019). Esse processo é influenciado pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal que regula a secreção de hormônios, como o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) do hipotálamo, além dos hormônios atuantes, FSH, LH, estrogênio, progesterona e outros, responsáveis por causar alterações cíclicas no ovário (JONES E SHIKANOV, 2019).

Durante a foliculogênese, a morfologia folicular é alterada devido ao crescimento oocitário, a proliferação e diferenciação das células da granulosa, bem como ao aparecimento das células da teca, da zona pelúcida e da formação de uma cavidade folicular, denominada antra, com presença de fluido folicular (BRISTOL-GOULD E WOODRUFF, 2006). Nesse contexto, os folículos são caracterizados como complexos em fases transitórias, apresentam um oócito circundado por células somáticas (células da teca interna e externa, células da granulosa e do cumulus) e são responsáveis por determinar o ciclo reprodutivo (SPITSCHAK E HOEFLICH, 2018). Na Tabela 1 é apresentada a cronologia da foliculogênese em bovinos e caracterização dos estágios folicular.

Baseado nos aspectos morfológicos dos folículos ovarianos, duas fases distintas podem ser definidas durante a foliculogênese: 1) fase pré-antral, ocorre a ativação dos folículos primordiais e o crescimento dos folículos primários e secundários 2) fase antral, que consiste no crescimento dos folículos terciários, com a formação da cavidade antral, e finalmente, a diferenciação destes em folículos pré-ovulatórios (SAUMANDE et al., 1981, RIMON-DAHARI et al., 2016).

Os folículos primordiais representam a grande maioria da população folicular presentes em ovários mamíferos formando o pool de reserva de folículos em estado quiescente (HICKEY et al., 2005, MORAES, 2014). Ao longo de toda a vida da fêmea, um pequeno grupo de folículos primordiais é gradualmente estimulado a crescer, constituindo a etapa de ativação folicular. Após esta fase, os folículos dão origem aos demais estágios de folículos em

crescimento (transição, primário, secundário, terciário e pré-ovulatório) (VAN DEN HURK E ZHAO, 2005, PEPE et al., 2006). A retomada da proliferação das células da granulosa marca o início da ativação folicular. Em seguida, passam por um processo sequencial de crescimento que é regulado por diversos hormônios e fatores de crescimento (HICKEY et al., 2005). Assim, folículos primordiais adquirem gradualmente células da granulosa em formato cubóide, tornando-se folículos de transição que são caracterizados pela presença de células da granulosa com ambos os formatos pavimentoso e cúbico (GOUGEON E BUSSO, 2000).

Tabela 1. Cronologia da foliculogênese em bovinos e caracterização folicular

Classe Folicular	Características	Dias de Gestação	Média Diâmetro	Referências
Primordial	Oócito esférico ou ovóide; uma camada de células da pré-granulosa de formato pavimentoso; membrana basal; sem zona pelúcida	130	40µm	Araújo et al. (2010); Lucci et al. (2001); Benedites; Baruselli (2011); Morais, 2014
Primário	Oócito esférico; uma camada de células da granulosa de formato cúbico; membrana basal; início de formação da zona pelúcida	140	100µm	Konig; Liebiche (2011); Lima-Verde et al. (2011)
Secundário	Oócito esférico; duas ou mais camadas de células da granulosa de formato cúbico; início da formação das células da teca (interna e externa); zona pelúcida bem definida	210	81-250µm	Honda et al. (2007); Almeida (1999); Fair et al. (1997); Lima-Verde et al. (2011)
Terciário	Oócito esférico; várias camadas de células da granulosa (muraís e cumulus) e da teca (interna e externa); membrana basal; zona pelúcida; início da formação do antro	230	0,5-3mm	Rodgers e Irving (2010); Leitão et al. (2009)
Pré-ovulatório	Oócito maduro; formação complexo cumulus oócito; várias camadas de células da granulosa (muraís e cumulus) e da teca interna e externa; membrana basal; zona pelúcida; antro de grande tamanho	272	18mm	Adona et al.(2013); Fortune et al. (2001)

FONTE: Autor

Em bovinos a comunicação entre o oócito e as células da granulosa de folículos primordiais e primários se dá através de endocitose. A membrana plasmática do oócito apresenta projeções que penetram entre as células da granulosa adjacentes tendo algumas microvilosidades aparecendo na superfície oocitária (LUCCI et al., 2001). Enquanto em folículos secundários e estágios subseqüentes, essa interação acontece por junções intercomunicantes do tipo *gap*, estas têm como funções a passagem de aminoácidos, nucleotídeos, hormônios, fatores de crescimento, íons inorgânicos, segundos mensageiros, dentre outros que contribuem para o crescimento e desenvolvimento folicular (SILVA et al., 2002, GOUGEON, 2010).

Alguns eventos que ocorrem durante a foliculogênese pré-antral, como os mecanismos envolvidos na inibição ou ativação folicular, bem como aqueles envolvidos no controle do crescimento de folículos primários e secundários, ainda se encontram não elucidados (FIGUEIREDO et al., 2007). A ativação folicular é um processo extremamente complexo, fazendo-se necessário a compreensão dos fatores envolvidos na regulação do funcionamento celular, os quais possuem papel essencial na reprodução. Assim, a compreensão desses eventos permite elevar a reprodução em animais domésticos, além de contribuir no desenvolvimento de métodos diagnósticos para casos de infertilidade e no incremento de métodos contraceptivos mais eficientes e seguros (DE CESARO, 2011).

Com o crescimento dos folículos secundários e organização das células da granulosa em várias camadas, ocorre a formação da cavidade antral. Os folículos passam então a ser classificados em terciários ou antrais (RODGERS E IRVING, 2010). A formação do antro durante o desenvolvimento folicular é intensificada pela atividade secretora das células da granulosa, aumento da vascularização folicular e permeabilidade dos vasos sanguíneos, os quais estão fortemente relacionados com o aumento do tamanho folicular (VAN DEN HURK E ZHAO, 2005, RODGERS E IRVING, 2010).

Em bovinos, o desenvolvimento de folículos antrais segue um padrão conhecido como onda de crescimento folicular que constitui três diferentes fases: recrutamento, seleção e dominância, ovulação (SOUZA et al, 2019). Na fase de recrutamento os folículos seguem o crescimento sob o controle das gonadotrofinas, enquanto, na fase seguinte, seleção e dominância, um folículo destaca-se dos demais em relação ao tamanho e assim, se torna dominante e responsável pela produção de quantidade elevada de estrógeno, vale ressaltar ainda, que durante essa fase o crescimento folicular é dependente da presença de FSH e LH (GIGLI et al., 2006). A terceira fase, diz respeito ao processo de ovulação, que acontece em

consequência do pico elevado de LH liberado pela hipófise, além disso, o aumento nos níveis de estrógenos e a diminuição dos níveis de progesterona fazem-se necessário para que aconteça a fase ovulatória. Dessa forma, havendo a presença de um corpo lúteo funcional, o qual é responsável pela produção de progesterona, não haverá ovulação. Após a ovulação, os folículos que não ovularam serão mortos por atresia (OLIVEIRA; SARAPIÃO; QUINTÃO, 2014).

2.2. Comunicação celular durante o desenvolvimento folicular

Durante o desenvolvimento folicular ocorre uma intensa comunicação bidirecional entre o oócito e as células somáticas, que permite a formação de um microambiente único ao redor do oócito, essencial para o crescimento folicular e competência oocitária (GREEN E SHIKANOV, 2016). A princípio, a proliferação e diferenciação celular durante a foliculogênese é administrada por vias endócrinas, parácrinas e autócrinas, no entanto, a comunicação intercelular faz-se essencial na transmissão de informações no ambiente folicular (AVILA, 2019, HUGH, 2018). Tal comunicação pode acontecer através de vários mecanismos, como as projeções transzonais (TZPs) que por meio da zona pelúcida fornecem suporte na comunicação entre o cumulus e o oócito, e a comunicação através de vesículas extracelulares (VE) (CLARKE, 2018).

A comunicação mediada por vesículas extracelulares vem ganhando grande destaque científico após relatos de que são secretadas por diversas células e encontradas também em fluidos corporais (CLARKE, 2018). Essas pequenas estruturas carregam em seu interior moléculas bioativas, como lípidos, proteínas, RNAm, DNA e miRNAs que modulam o funcionamento de células alvo mesmo em condições fisiológicas ou patológicas. Os miRNAs carregados por VE são alvos de estudos que envolvem a fisiologia ovariana, pois são responsáveis por modular transcritos envolvidos em processos reprodutivos (AVILA, 2019). No ovário as VE são produzidas nas células da granulosa e trafegam para o fluido folicular ou da extremidade principal das TZPs para o oócito, e assim regulam vias que atuam no controle do crescimento folicular, na resposta hormonal, na maturação citoplasmática dos oócitos, na retomada da meiose, bem como na expressão gênica pós-transcricional (Figura 1) (CLARKE, 2018, NAVAKANITWORAKUL et al., 2016).

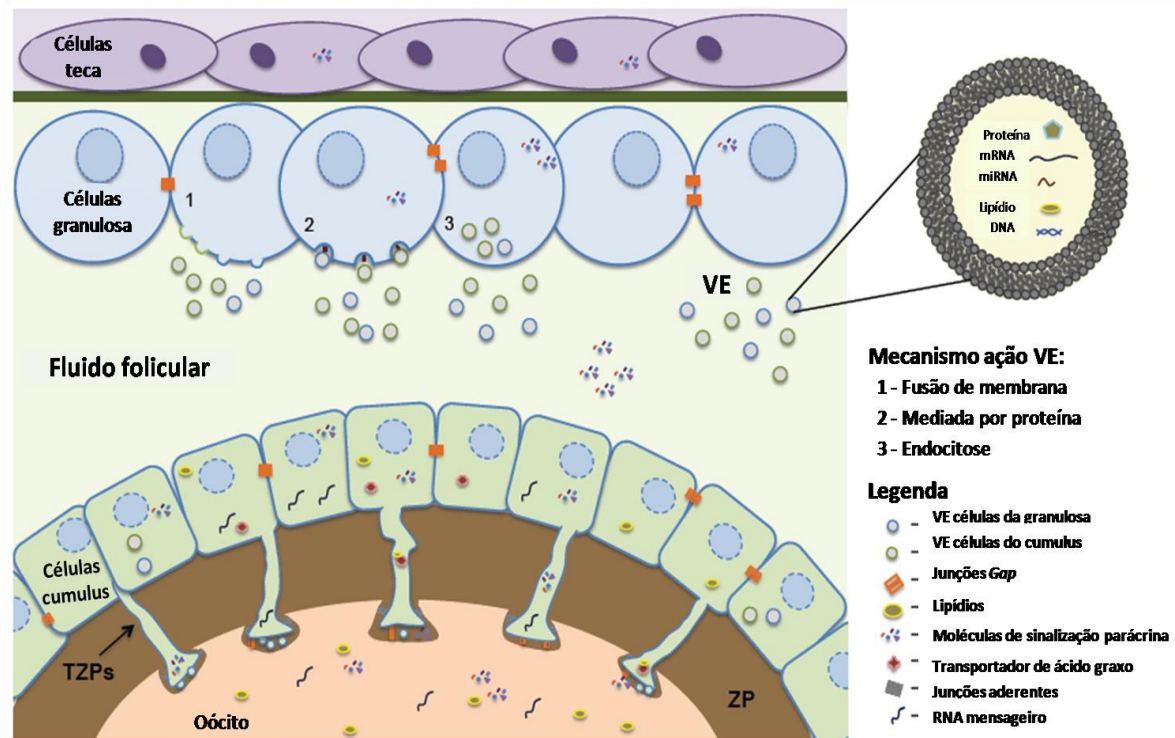


Figura 1. Comunicação celular no microambiente do folículo ovariano. TZPs: projeções transzonais; VE: vesículas extracelulares; ZP: zona pelúcida. Modificado de ANDRADE et al., 2019.

Os principais tipos de VE compreendem as microvesículas (100 a 1000nm), que são brotadas na membrana plasmática e do tipo exossomos (50 a 200nm), são pequenas estruturas que surgem de invaginações endocitóticas no compartimento endossômico, gerando corpos multivesiculares (MVBs) que incluem múltiplos exossomos (CLARKE, 2018). Para alcançar células alvo, as VE atuam através: 1) interação entre as proteínas de membrana que ativam células alvo; 2) ligação de produto de clivagem de proteínas de membrana das VE em receptores de células alvo; 3) transferência de moléculas a partir da fusão de VE e célula alvo (MATHIVANAN E SIMPSON, 2010).

Em células da granulosa bovina foi observada a captação de VE do fluido folicular e sua presença em projeções citoplasmáticas entre células do cumulus e o oócito em estágio inicial, confirmando assim, seu papel como mediadora de sinalização, além disso, identificaram 280 miRNAs, alguns capazes de regular a via do fator de crescimento semelhante à insulina 2 (IGF2) envolvida no crescimento folicular e no controle da esteroidogênese (SPITSCHAK E HOEFLICH, 2018). VE originadas de folículos de tamanhos diferentes estimulam de forma distinta a proliferação de células da granulosa, o que corrobora com o fato de que há diferente conteúdo ou do envolvimento destas VE de acordo com o tamanho do folículo ovariano (HUNG et al., 2017). Assim, essas pequenas

estruturas podem contribuir no esclarecimento acerca dos mecanismos envolvidos na foliculogênese pré-antral, podendo atuar como biomarcadores e veículo de substâncias de interesse (AVILA, 2019). Dessa forma, o desenvolvimento de sistemas de cultivo *in vitro* que suportem o crescimento oocitário forneceria uma visão abrangente sobre os eventos associados ao desenvolvimento folicular, e assim, contribuir no avanço da pesquisa básica que envolve a fisiologia ovariana.

2.3. Isolamento folicular

Para o sucesso do cultivo *in vitro* é necessário o emprego de métodos eficazes que permitam um isolamento adequado, evitando danos estruturais e garantindo a sobrevivência folicular (ROSSETO et al., 2011).

O processo de isolamento consiste na dissociação ou separação dos folículos pré-antrais dos demais componentes do estroma ovariano (fibroblastos, fibras colágenas e elásticas, fibronectina), utilizando-se para isto, digestão enzimática, instrumentos mecânicos ou a associação dos dois (FIGUEIREDO et al., 2008). Para o método enzimático, utiliza-se enzimas digestivas, como colagenase, tripsina e DNase, que digerem o estroma ovariano possibilitando o isolamento de um elevado número de folículos. No entanto, este método pode ser danoso às células da teca ou à membrana basal, principalmente, quando o tempo de incubação não é rigorosamente controlado o que pode comprometer a estrutura folicular (DEMEESTERE et al., 2005). Já para o método de isolamento mecânico utiliza-se equipamentos como, tesouras cirúrgicas, *tissue chopper*, micro fórceps e/ou agulhas dissecantes para isolamento dos folículos contidos nos fragmentos ovarianos, e, apesar de o método mecânico resultar em menor número de folículos isolados em relação ao método enzimático, ele preserva melhor a estrutura das células da teca e da membrana basal, além de ser mais econômico e de maior facilidade de execução (ROSSETO et al., 2011). Além disso, é possível preservar também por esse método, os receptores de superfície, bem como a interação entre os diferentes compartimentos foliculares (KURUVILLA, 2010).

O método mecânico de isolamento folicular tem sido aplicado com sucesso em folículos pré-antrais de bovino (ITOH et al., 2002, VASCONCELOS et al., 2021), primata (DOMINGUES, 2003), humano (MARTINEZ-MADRID et al., 2004), ovino (TAMILMANI et al., 2005), bubalino (SHARMA et al., 2009), canino (ALVES et al., 2012), equino (HAAG et al., 2013) e murino (ZHANG et al., 2016). Ainda, a associação desses dois métodos, enzimático e mecânico vêm se tornando uma alternativa para o isolamento de folículos pré-antrais, o qual possibilita o resgate de muitos folículos quando comparado

com a aplicação dos métodos isolados (FIGUEIREDO et al., 1993). A associação dos métodos tem sido aplicado com sucesso em bovinos (FIGUEIREDO et al., 1993, OKTAY et al., 1997), humanos (DONG et al., 2014) e ovinos (SADEGHNIA et al., 2016).

2.4. Cultivo in vitro de folículos pré-antrais

O cultivo in vitro de folículos pré-antrais tem sido amplamente pesquisado com o intuito de testar e avaliar o efeito de diferentes substâncias (hormônio, fatores de crescimento e antioxidantes), e por tanto, estimular o desenvolvimento folicular in vitro, mimetizando os eventos que ocorrem in vivo, permitindo assim, a obtenção de oócitos maduros, aptos a serem utilizados em outras biotécnicas (MAO et al., 2002). Diversos sistemas de cultivo in vitro com folículos pré-antrais inclusos em fragmentos do córtex ovariano (in situ) ou na forma isolada, 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 E LIMA, 2017).

No cultivo in situ, os folículos pré-antrais permanecem inclusos no córtex de tecido ovariano, permitindo a manutenção da 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'BRIEN et al., 2003). De acordo com Aguiar et al (2016), o cultivo in situ favorece de maneira significativa o crescimento folicular, visto que o ambiente nessas condições aproxima-se do ambiente ao qual o folículo está inserido in vivo, evitando ainda a exposição prolongada das células ao meio externo e facilitando uma melhor perfusão do meio de cultivo para o tecido ovariano.

No tocante ao cultivo de folículos isolados, os folículos pré-antrais devem ser desprendidos do tecido ovariano que o envolve (PAES et al., 2016). O isolamento propicia um acompanhamento individual durante o desenvolvimento folicular em condições in vitro sob o contato do meio de que possui a substância de interesse, outro parâmetro favorável é que se caso o folículo sofra atresia durante o cultivo, as substâncias produzidas em decorrência deste processo, não afetarão outros folículos (MBEMYA, 2019). O cultivo de folículos isolados pode ser feito utilizando o sistema bidimensional, tridimensional ou ambos (ARAÚJO et al., 2014a).

O cultivo bidimensional é a estratégia mais amplamente utilizada no estudo da fisiologia ovariana (FELGUEIRAS et al., 2020). Nesse sistema de cultivo o folículo é colocado diretamente sobre a placa de cultivo (ARAÚJO et al., 2014a, SILVA et al.,

2015), ou sobre uma camada de células somáticas ou de matriz extracelular, como o *alginato*, tendo acesso a meios e fatores de crescimento (VANACKER E AMORIM, 2017). Estudos em diferentes espécies domésticas demonstraram que folículos secundários isolados são capazes de crescer e formar antro nesse tipo de sistema de cultivo (caprino: MBEMYA et al., 2018; ovino: CAVALCANTE et al., 2017; suína: WU E TIAN, 2007; bovinos: PAULINO et al., 2020, VASCONCELOS et al., 2021).

No sistema de cultivo tridimensional, o folículo é inserido dentro de uma monocamada de substrato, constituída por matriz extracelular (colágeno; fibrina e alginato) ou componentes do estroma ovariano (células da granulosa e fibroblastos), com a finalidade de manter a morfologia tridimensional dos folículos, bem como as interações célula-célula e célula-matriz, importantes para a regulação do desenvolvimento folicular (ARAÚJO et al., 2014a). Apesar dos resultados com esse tipo de sistema tenham sido promissores, o único relato de nascimento obtido a partir de folículos pré-antrais desenvolvidos *in vitro* foi obtido utilizando o sistema de dois passos (EPPIG E O'BRIEN, 1996, O'BRIEN et al., 2003). Nesse sistema de cultivo é realizado primeiro o cultivo *in situ*, que permitirá a ativação e o desenvolvimento do folículo primordial ao estágio subsequente (secundário), para em seguida ser isolado e cultivado até o estágio antral (FIGUEIREDO et al., 2018).

Desse modo, ambos os sistemas de cultivo não apenas fornecem modelos de cultivo ideais para investigar a fisiologia ovariana, mas também apoiam a prática clínica para obter oócitos competentes para outras biotécnicas, como a fertilização *in vitro* (FIV) (SHOOREI et al., 2017, BRITO et al., 2014).

2.4.1. Meio de cultivo in vitro para folículos pré-antrais

Para assegurar o sucesso do cultivo *in vitro* é essencial um meio que mimetize as condições encontradas *in vivo*. Dessa forma, os meios de cultivo devem fornecer condições adequadas de pH e osmolaridade, bem como substâncias capazes de influenciar a sobrevivência e o crescimento folicular (MORAES et al., 2008, BRUNNER et al., 2010). Neste sentido, muitos estudos têm proposto a utilização de diversos meios de cultivo que atenda os requisitos nutricionais de várias células, como o Meio Essencial Mínimo Alfa (α -MEM), Meio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) (PHELAN E MAY, 2015) ou o Meio de Cultivo Tecidual-199 (TCM-199) (ROSSETTO et al., 2013). Destes, o TCM-199 é bastante utilizado no cultivo de folículos isolados (PAULINO et al., 2018, VASCONCELOS et al., 2021), o qual apresentou mais eficácia em promover o crescimento folicular, formação

do antro, manutenção da morfologia, viabilidade e funcionalidade folicular quando comparado ao α -MEM e McCoy em folículos pré-antrais isolados de ovários bovinos (ROSSETTO et al. 2013). No entanto, além dos componentes já contidos na formulação original desse meio, incluindo sais inorgânicos, vitaminas, aminoácidos essenciais e não essenciais (LIN et al., 2014) outros compostos favoráveis ao desenvolvimento de folículos pré-antrais podem ser adicionados, tais como antibióticos (penicilina/estreptomicina), antioxidantes (transferrina, selênio e ácido ascórbico), tampões (Hepes), substâncias energéticas (glutamina e hipoxantina) e protéicas (albumina sérica bovina), além de hormônios (insulina e FSH) (Tabela 2) (KAMALAMMA, et al. 2016).

Tabela 2: Substâncias associadas ao meio base de cultivo para folículos pré-antrais bovinos isolados

Tipos de suplementos	Função	Autores
Albumina sérica bovina	Quelante de metais pesados; previne a aderência das células às superfícies plásticas ou de vidro; sequestra EROS	Jin et al. (2009); Mehta e Kiessling (1990); Otsuki et al. (2012)
Penicilina/Estreptomicina	Evita contaminações por microorganismos	Bucher et al. (2009)
Glutamina	Fonte de energia secundária para o metabolismo; fonte de Carbono e Nitrogênio	Freshney (2005); Figueiredo et al. (2002)
Hipoxantina	Purina relacionada à formação de ATP	Biasibetti-Brendler et al. (2018)
Insulina	Transposta glicose; anti-apoptótica; mitogênica	Augustin et al. (2003); Lee et al. (2005)
Transferrina	Carreadora de ferro intracelular; quelante de radical hidroxila	Van Der Valk et al. (2010); Córdova et al. (2010)
Selênio	Quelante de íons metálicos; estimula a síntese de GSH; elimina EROS	Lima e Hansel (2000) Silva et al. (2011); Vega et al., 2016
Ácido Ascórbico	Reduz EROS; aumenta os níveis intracelulares de GSH; cofator na síntese de colágeno	Moraes et al. (2008); Kere et al., 2013
Hormônio Folículo Estimulante	Impulsiona a proliferação e diferenciação de células da granulosa	Magalhães et al. (2009)

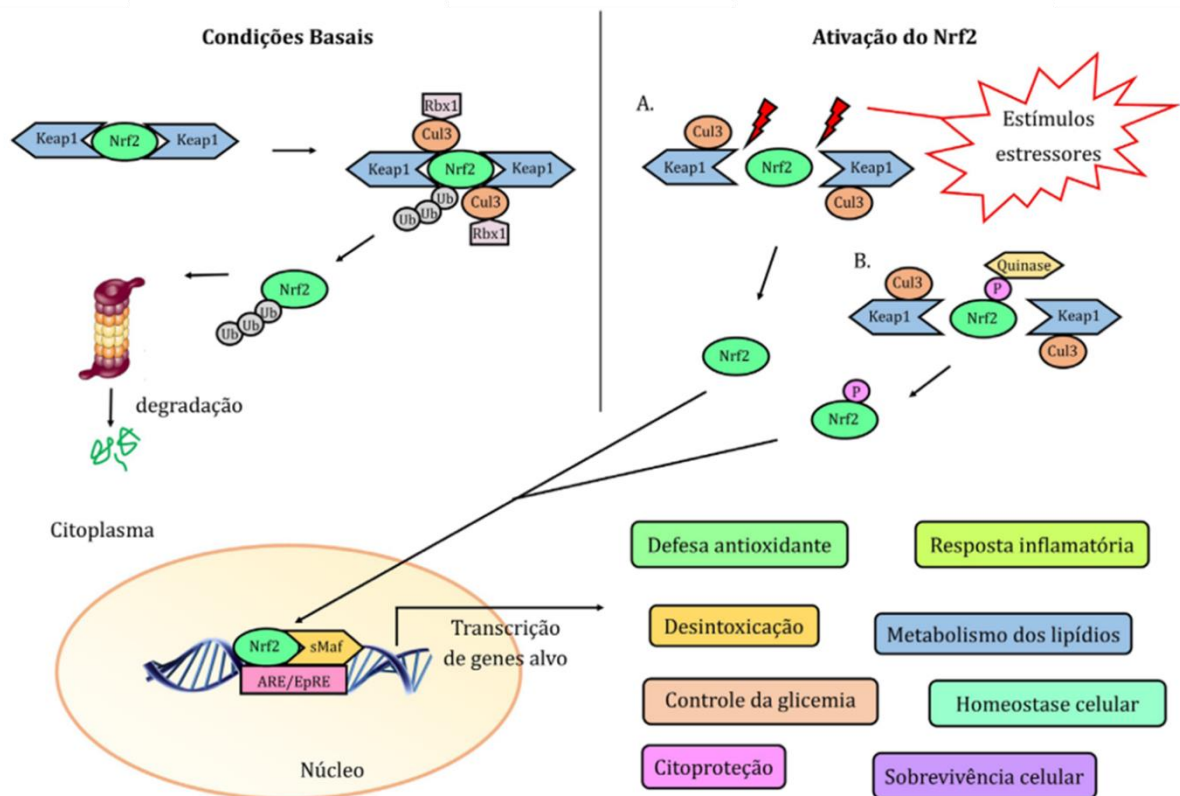
FONTE: Autor.

2.5. Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo durante o cultivo folicular *in vitro*

As EROS representam uma categoria de moléculas que incluem os radicais livres e não-radicaais, derivados da reação de redução do oxigênio (O_2). São eletricamente instáveis e altamente reativas, caracterizadas pela perda de um ou mais elétrons em sua última camada eletrônica (ALVES et al., 2010). Em organismos aeróbicos a produção de EROS ocorre de forma natural por meio de diversas vias metabólicas e enzimáticas, tendo a fosforilação oxidativa como a principal via e as mitocôndrias como as principais fontes endógenas de produção, além dos peroxissomos, lisossomos e da membrana plasmática (AGARWAL et al., 2014, MARTELLI E NUNES, 2014, IDELCHIK et al., 2016). Os três principais tipos de EROS com funções fisiológicas são ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\cdot}) (LU et al., 2018).

Em níveis basais as EROS desempenham papéis importantes na produção de energia, fagocitose, na regulação do crescimento e sinalização celular, na síntese de substâncias biológicas importantes, além de atuar como mensageiros secundários em diversas cascatas de sinalização intracelular (BARREIROS et al., 2006, RATHEE et al., 2006). No ovário as EROS contribuem para diversas funções fisiológicas, como a gênese de esteróides ovarianos, maturação de oócitos, ovulação, formação de blastocistos, implantação, luteólise e manutenção lútea na gravidez (LU et al., 2018). No entanto, quando há um desequilíbrio entre a produção desses compostos oxidáveis e a capacidade dos sistemas de defesa antioxidante, ocorre o estresse oxidativo (SAHEBKAR et al., 2015). Este, por sua vez é responsável por alterar diversas moléculas intracelulares e causar diversos efeitos deletérios, afetando várias funções e processos celulares, oxidando proteínas, induzindo danos ao DNA, a peroxidação de lipídios, as mitocôndrias, podendo levar à morte celular por necrose ou apoptose (JIANG E JAMESYIN, 2019, HALLIWELL et al., 2006, SILVA et al., 2011).

Em resposta ao estresse oxidativo as células podem responder de diversas maneiras, como, transcricionalmente, por meio da ativação do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nfr2), responsável por desempenhar papel chave na expressão de genes relacionados as enzimas antioxidantes (Figura 2) (SOHEL et al., 2017).



A ativação de Nrf2 pode ser mediada por vesículas extracelulares (exossomos) que atuam na regulação das funções fisiológicas (ELDH et al., 2010). Porém, em situações de estresse oxidativo, essas vesículas são liberadas do espaço extracelular para as células receptoras, transportando diferentes macromoléculas citosólicas (mRNA, miRNA e proteínas), que leva a modificações nos seus mecanismos de defesa e evita a morte celular (SOHEL et al., 2013). Saeed-zidade, et al. (2017) observou que durante o desenvolvimento folicular em bovinos os exossomos são essenciais, pois participam da comunicação bidirecional entre as células da granulosa e o oócito, protegendo as células em condições de estresse oxidativo.

Figura 2. Esquema ilustrativo da via de sinalização Nrf2/Keap1. Fonte: HAHN; OLIVEIRA; BOCK (2017).

De acordo com a Figura 2 em condições basais o Nrf2 é mantido no citoplasma das células por meio de duas proteínas inibitórias Keap1, (Kelch-like ECH-associated Protein 1), que funcionam como intermediárias para a ligação do complexo Cul3-Rbx1 (E3-ubiquitina ligase complex/Ring box protein 1) responsável por marcar ubiquitinação do Nrf2 para degradação via proteossoma 26S (MIMURA E ITOH, 2015, SAEED-ZIDANE et al., 2017). Sob condições de estresse oxidativo, resíduos reativos de cisteína são oxidados em Keap1, promovendo modificações na conformação de Keap1 e, por conseguinte, a liberação do Nrf2.

Uma vez livres, as moléculas de Nrf2 posicionam-se no núcleo celular associando-se às proteínas sMaf (small aponeurotic fibrosarcoma). Esse complexo liga-se no elemento de resposta antioxidante (ARE) ou ao elemento de resposta eletrofílica (EpRE), situados na região promotora dos genes alvos. Dessa forma, o complexo Nrf2/sMaf, ao se ligar em ARE ou EpRE, promove o início do processo de transcrição dos genes, bem como aqueles relacionados à defesa antioxidante, incluindo peroxiredoxina-1 (PRDX1), catalase (CAT), superóxido dismutases (SODs) e tioredoxina-1 (TXN), sendo assim considerado, o regulador chave da resposta antioxidante no organismo, desempenhando papel crítico para proteção e sobrevivência celular (SOHEL et al., 2017, NITURE; KHATRI; JAISWAL, 2014). Os riscos de desenvolvimento de EO são maiores em condições in vitro do que in vivo (GUPTA et al., 2009).

Durante o metabolismo folicular in vitro o estresse oxidativo é observado, devido um aumento nos níveis de EROS provocadas por alguns fatores, como a exposição a concentrações de oxigênio superiores às fisiológicas (20%), variações na temperatura (GRUPTA et al., 2009), exposição aos comprimentos de onda da luz visível (TAKENAKA; HORIUCHI; YANAGIMACHI, 2007), alterações de pH e diferentes composições do meio (MARTÍN-ROMERO et al., 2008) podendo os folículos apresentarem menor capacidade de desenvolvimento quando comparado aqueles cultivados in vivo e com isso, limitar o sucesso do cultivo (VON MENGDEN et al., 2020).

Mitocôndrias, retículo endoplasmático e membrana celular são as principais estruturas celulares afetadas pela oxidação produzida durante as reações de busca por estabilidade das EROS (GUPTA et al., 2010). O dano provocado às mitocôndrias pelas EROS leva à degeneração das células da granulosa e a uma diminuição na qualidade do folículo ovariano bem como na competência do oócito (SHI et al., 2016). Durante o desenvolvimento folicular as células da granulosa podem apresentar um crescimento irregular e perda da função devido o estresse oxidativo, levando a apoptose dessas células e, por conseguinte, à atresia folicular, resultando em disfunção oocitária (ZHANG et al., 2016, LI et al., 2016, LEE et al., 2013).

Chaube et al. (2014) demonstraram que o estresse oxidativo foi capaz de interromper a comunicação entre oócitos e células da granulosa promovendo uma diminuição da qualidade dos oócitos. Tal evento promove uma reação inflamatória acentuada que ocorre tanto no oócito como nas células da granulosa induzindo a um desequilíbrio no fator de crescimento e na produção de citocinas, levando assim a um efeito prejudicial na reprodução (CHAUBE et al., 2014, AGAWAL E GUPTA, 2006).

Dessa forma, o desequilíbrio na produção de EROS que ocorre durante as condições de cultivo *in vitro* pode ser controlado por meio do uso de substâncias antioxidantes, que mesmo em pequenas concentrações possuem a função de atenuar a oxidação de um substrato (IDELCHIK et al., 2016).

2.6. Antioxidantes como suplemento do meio de cultivo

Os antioxidantes são fatores chave para manter o equilíbrio entre a produção e a eliminação de EROS. Atuam doando elétrons aos radicais livres, convertendo-os em água a fim de prevenir a superprodução e inibir os efeitos deletérios (BALL et al., 2001). Uma interrupção nos sistemas antioxidantes pode induzir consequências patológicas no ovário mamífero, influenciando assim, a foliculogênese, a maturação do oócito, ovulação, fertilização, implantação, desenvolvimento embrionário, bem como no sucesso da gravidez (WANG et al., 2017).

As substâncias antioxidantes são responsáveis por controlar a autooxidação, e assim, interromper a propagação de radicais livres ou inibir a formação destes, podem agir por meio de três diferentes mecanismos: prevenção, varredura e reparo (TAN et al., 2018). A prevenção atua contra o dano oxidativo interferindo na produção de EROS, a varredura consiste em neutralizar as EROS, impedindo sua ação, aceitando ou doando elétrons, visto que a estrutura dos antioxidantes permite que elétrons desemparelhados se mantenham estáveis sem acometer outras moléculas, já o mecanismo de reparo age na remoção de biomoléculas danificadas, antes que estas levem à modificações no metabolismo celular, atuando na reconstituição das estruturas biológicas lesionadas (BARBOSA et al., 2010, PISOSCHI E POP, 2015). Este último mecanismo opera através da ação de enzimas lipolíticas (lipases), proteolíticas (peptidases ou proteases) e outras enzimas (enzimas de reparo do DNA, ligases, nucleases, polimerases, proteinases, fosfolipases e transferases) (SURAI; FISININ; KARADAS, 2016).

Como proteção, as células possuem dois sistemas de defesa antioxidante, divididos em enzimático e não enzimático, presentes tanto no meio intra como extracelular (GUPTA et al., 2009, CHEESEMAN E SLATER, 1993). Os antioxidantes enzimáticos, são os primeiros a agirem, participação na quebra e remoção de EROS, além de serem essenciais na prevenção a peroxidação lipídica e no funcionamento adequando da célula (NIMSE E PAL, 2015, COMBELLES et al., 2009). Dentre as enzimas que compõem este sistema, incluem: SOD, CAT, PRDX, glutathiona peroxidase (GPX) e glutathiona redutase (GR). Enquanto, o sistema não enzimático é composto por uma variedade de substâncias de baixo peso molecular adquirida principalmente de fontes exógenas ou naturais, como ácido ascórbico (vitamina

C), o α -tocoferol (vitamina E), diferentes compostos de selênio, ubiquinonas (coenzima Q), carotenóides (carotenos e xantofilas), polifenóis (flavonóides, flavonóis, flavonas, flavanonas, antocianinas, isoflavonas, ácidos fenólicos, taninos, estilbenos e lignanas) e os extratos de plantas (MAIA, 2006).

No tocante as altas taxas de compostos oxidáveis que são produzidas durante o cultivo in vitro de folículos pré-antrais, enzimas antioxidantes, como SOD, CAT, GPX e PRDX acabam sendo afetadas por operarem em conjunto a fim de manter os níveis de EROS dentro dos limites fisiológicos e, desta forma, são utilizadas para medir os níveis de estresse oxidativo (LUSHCHAK, 2014).

2.6.1. Mecanismo de ação das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPX1 e PRDX6 no ovário mamífero

Em condições de estresse oxidativo as células implantam um sistema de defesa antioxidante baseado em componentes enzimáticos, dentre os quais, pode destacar a SOD, CAT, GPX1 e PRDX6.

A superóxido dismutase (SOD) age transformando dois ânions de superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (ANDRADE et al., 2010). Essa enzima apresenta três isoformas que diferem entre si quanto à natureza do centro ativo do metal, composição de aminoácidos, co-fatores e outras características (SHENG et al., 2014). Os três diferentes tipos de SOD, incluem a dependente de sódio e zinco (Cu/Zn-SOD) a dependente de manganês (Mn-SOD) e a extracelular (Ec-SOD) (ZELKO; MARIANI; FOLZ, 2002). A atividade enzimática da SOD está positivamente relacionada com os níveis de estradiol no fluido folicular (WANG et al., 2017). Estudos demonstraram que a atividade de SOD é maior em folículos pequenos e médios quando comparado aos antrais grandes (EL-SHAHAT, 2012, COMBELLES et al., 2010, HOZYEN et al., 2014). Em oócitos bovinos uma grande quantidade Mn-SOD é localizada nas mitocôndrias, sendo assim a principal enzima eliminadora de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial (JOHNSON E GIULIVI, 2005).

No que diz respeito à CAT, trata-se de uma enzima antioxidante que desempenha papel-chave no metabolismo de EROS, é encontrada principalmente nos peroxissomos. Sua ação enzimática é dependente da concentração de H_2O_2 , este em níveis elevados faz com que a CAT atue catalisando H_2O_2 e formando água e oxigênio, já em concentrações baixas e na presença de um doador de hidrogênio adequado, como etanol, metanol, fenol e outros, agem removendo H_2O_2 , porém oxidando seu substrato através de uma reação peroxica (ALI et al., 2020). A CAT protege os oócitos do estresse oxidativo gerado pelos processos metabólicos

fisiológicos, como a esteroidogênese no ovário (WANG et al., 2017). Em camundongos, foi reportado alguns defeitos cromossômicos no núcleo oocitário após inibição da enzima CAT, como desalinhamento cromossômico e dano ao DNA, além disso, foi demonstrado que durante a maturação oocitária a catalase protege o genoma de danos oxidativos (PARK et al., 2016). Em ratos a expressão de CAT é relativamente baixa no oócito quando comparado a outro tipo de células foliculares, como a da granulosa e teca (ENDERS E NELSON, 1973).

A GPX1 é uma enzima dependente de selênio, atua como catalisador da redução do H_2O_2 ou hidroperóxidos orgânicos para a água e oxigênio ou os álcoois correspondentes, respectivamente, por meio da glutatona como redutora (FLOHE; TOPPO; COZZA, 2011). Em mamíferos é localizada no citosol e nas mitocôndrias exercendo função antioxidante (MARGIS et al., 2008). Tal enzima já demonstrou papel importante de proteção aos ácidos graxos poliinsaturados de membrana (GATHWALA E AGGARWAL, 2016). Abedelahi e Salehnia (2010) ao adicionarem selênio de sódio no meio de cultivo in vitro de folículos pré-antrais murinos relataram um aumento significativo na expressão de GPX1 e conseqüentemente uma diminuição de EROS, potencializando a taxa de desenvolvimento folicular.

A PRDX6 (Prdx6, 1-cys peroxiredoxin) é a única das peroxiredoxinas que possui apenas um grupo cisteína, utilizando por tanto a GPX para concluir sua reação peroxidática catalítica (KANG et al., 1998, MANEVICH et al., 2004). A PRDX6 atua na redução de H_2O_2 , hidroperóxidos fosfolipídicos e hidroperóxidos de cadeia curta através da ação da GPX. Além de suas atividades já conhecida a PRDX6 também expressa a fosfolipase A2 independente de cálcio e ácido (aiPLA2) e atividades de lisofosfatidilcolina acil transferase (LPCAT) em sítios catalíticos distintos, sendo regulada através da localização subcelular de proteínas, ligação ao substrato e modificações pós-traducionais (HUANG et al., 2011, FISHER et al., 2016). Leyens et al. (2004) relataram que as células do cumulus de oócitos bovinos controlam a expressão de PRDX6 através das junções *gap* durante a maturação in vitro, além disso relataram que GDF-9 aumenta a expressão de PRDX6, confirmando assim o envolvimento desta enzima no processo de maturação oocitária.

2.6.2. Antioxidantes naturais

Na tentativa de atenuar os altos níveis de EROS produzidos durante o cultivo in vitro de folículos ovarianos, diferentes antioxidantes sintéticos têm sido adicionados ao meio de cultivo, como transferrina, selênio e o ácido ascórbico, no entanto outras substâncias, as de

origem natural, como os extratos vegetais vem sendo bastante explorados para tal finalidade. Os antioxidantes naturais são moléculas encontradas livremente na natureza seja em frutas, sementes ou em plantas (BAUER et al., 2001). As plantas medicinais apresentam diferentes compostos bioativos que podem atuar através de sua capacidade de eliminar as EROS (HARBORNE, 1999). Nesse contexto, muitos extratos vegetais com capacidade antioxidante têm sido extraídos e utilizados em associação ao meio de cultivo de folículos ovarianos (BARBERINO et al., 2015; GOUVEIA et al., 2016, CAVALCANTE et al., 2017a, MBEMYA et al., 2018, SEGHINSARA et al., 2019). Mais informações sobre os principais efeitos antioxidantes dos extratos vegetais utilizados como suplementos ao meio de cultivo de células reprodutivas femininas e no desenvolvimento embrionário encontram-se compiladas no artigo de revisão (Capítulo 1), que compõe a presente dissertação.

2.7. *Aloe vera*

Aloe vera é uma planta que apresenta ampla aplicação na medicina tradicional, popularmente conhecida como babosa e bastante utilizada pela população brasileira para fins alimentícios, farmacêuticos ou cosméticos (GAMBOA-GÓMEZ et al., 2015). Aloes são xerófitos que crescem em climas tropicais, semitropicais e áridos em todo o mundo, pertencem à família Liliaceae, são perenes de haste curta, que atingem uma altura de 60 a 100cm (KUMAR et al., 2019, BENZIE E WACHTEL-GALOR, 2011). A planta tem folhas verdes pontiagudas, suculentas e carnudas que são estratificadas em duas partes principais, uma externa composta pela casca verde, constituída de epiderme, parênquima clorofiliano e feixes vasculares, e outra que forma o tecido interior, de aspecto mucilaginoso e incolor, espesso, denominado de polpa ou gel da folha (DARZI et al., 2021, RAMOS E PIMENTEL, 2011), desse modo, as espécies de *Aloe* têm sido alvo de interesse por parte de pesquisadores que tentam identificar os compostos responsáveis pelos seus efeitos benéficos e apontar novas utilidades para a planta. A *Aloe vera* tem despertado grande interesse dos pesquisadores, devido às suas propriedades terapêuticas, como imunoestimulador, antiinflamatório, antineoplásica, cicatrizante de feridas, radioprotetor, antibacteriano, antiviral, antifúngico, antidiabético e atividade antioxidante que denotam diferentes mecanismos de ação (Figura 3) (YAGI et al., 1999, KUMAR et al., 2019).

Estudos já demonstraram que a *Aloe vera* possui forte propriedade antioxidante devido a presença de polissacarídeos, antraquinonas e compostos fenólicos, como catequina, ácido sinápico, quercitrina, ácido genticóico, carotenóides, α -tocoferol, epicatequina e flavonóides presentes no gel mucilaginoso (RADHA E LAXMIPRIYA, 2015, HES et al.,

2019). No entanto o potencial de ação antioxidante da *Aloe vera* depende de fatores externos, como tipo e as condições de cultivo da planta, o tempo da colheita, clima, posição das folhas no caule, a espécie de Aloe e o método usado para colheita das folhas (GIANNAKOUDAKIS et al., 2018).

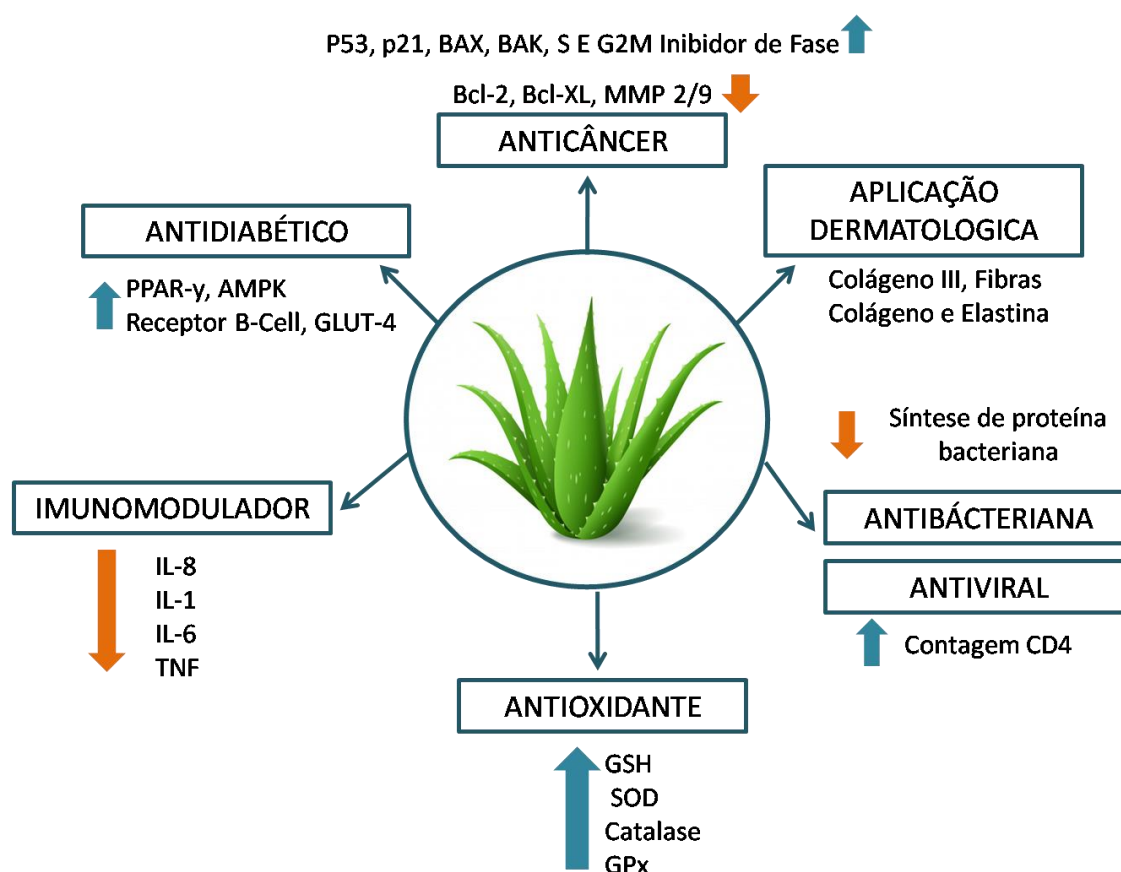


Figura 3. Mecanismo de ação subjacente às propriedades farmacológicas da *Aloe vera*. Fonte: Adaptado de KUMAR et al. (2019).

Os componentes bioativos presentes no gel mucilaginoso são divididos em duas categorias principais: constituintes nutritivos, que incluem carboidratos, vitaminas, enzimas, minerais e oligoelementos, proteínas e aminoácidos, enquanto os constituintes não nutritivos incluem compostos orgânicos, fitoesteróis, compostos fenólicos e outros (JAVED AND ATTA-UR, 2014; DARZI et al., 2021) (Tabela 3).

No tocante ao potencial de eliminação de radicais livres da AV, Anilakumar et al. (2010) demonstraram que essa planta apresentou atividade de eliminação de radicais livres superior (72,2%) ao α -tocoferol (65,6%). Shahraki et al. (2014) também relataram que a AV tem efeito antioxidante, melhorando as características histológicas dos testículos de ratos. Em murinos, ao verificar os efeitos do extrato de AV contra danos hepáticos induzido por estresse oxidativo, foi possível demonstrar uma redução na formação de peroxidação lipídica

(NAHAR et al., 2013). Uma investigação recente demonstrou que o extrato de *Aloe vera* regulou positivamente a expressão das enzimas SOD2 e CAT em células epiteliais da córnea humana (CEVAROLO et al., 2021). Sumi et al. (2019) demonstraram que *Aloe vera* aumentou na atividade de enzimas antioxidantes, como CAT e SOD, além de aumentar o GSH no tecido cardíaco de ratos. Concomitante a esses resultados, uma diminuição expressiva do malondialdeído também foi observada. Majumder et al. (2019) demonstraram que a atividade de eliminação de radicais livres do extrato de *Aloe vera* pelo método de DPPH é de 67 a 89% quando comparada ao ácido cítrico que é de 67 a 84%, desse modo o extrato de *Aloe vera* pode ser um potente eliminador do radical livre de oxigênio.

Tabela 3. Componentes bioativos do extrato de *Aloe vera*.

Classes	Componentes
Antraquinonas/ Antronas	Aloe-emodina, ácido aloético, antranol, aloína A e B (conhecidos coletivamente como barbalóina), isobarbalóina, emodina, éster de ácido cinâmico
Carboidratos	Manano puro, manano acetilado, glucomanano acetilado, glucogalactomanano, galactano, substância pécica, arabinogalactano, galactoglucoarabinomanano, galactogalacturano, xilano, celulose
Enzimas	Fosfatase alcalina, amilase, carboxipeptidase, carboxilase, catalase, ciclooxygenase, fosfoenolpiruvato, ciclooxygenase, superóxido dismutase, lipase, oxidase
Compostos inorgânicos	Cálcio, cloro, fósforo, cromo, cobre, magnésio, ferro, manganês, potássio, sódio, zinco
Aminoácidos não essenciais/essenciais	Alanina, arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, glicina, histidina, hidroxiprolina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, treonina, tirosina, valina, fenilalanina
Proteínas	Lectinas, substância semelhante à lectina
Sacarídeos	Manose, glicose, L-ramnose, aldopentose
Vitaminas	B1, B2, B6, C, β -caroteno, colina, ácido fólico, α -tocoferol
Diversos	Ácido araquidônico, ácido γ -linolênico, sorbato de potássio, esteróides (campesterol, colesterol, β -sitosterol), triglicerídeos, triterpenóide, giberelina, ligninas, ácido salicílico, ácido úrico

Na área da reprodução animal, Costa (2020) demonstrou a ação do gel mucilaginoso de *Aloe vera* tanto no cultivo in vitro como na criopreservação do tecido ovariano bovino. No cultivo, a *Aloe vera* manteve os níveis de colágeno no tecido, melhorou a integridade morfológica dos folículos pré-antrais e induziu a ativação e desenvolvimento folicular. No protocolo de criopreservação, a *Aloe vera* também manteve os níveis de colágeno no tecido ovariano e as taxas de folículos saudáveis, bem como aumentou as taxas de ativação foliculares os níveis de mRNA para enzimas antioxidantes SOD, PRDX6 e GPX1. O gel da *Aloe vera* já mostrou ação também na criopreservação de gametas masculinos, tanto em animais silvestres (SOUZA et al., 2016) como em domésticos (AGUIAR et al., 2012). Além disso, em estudo com 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 E JAVDAN, 2011).

Apesar desses relatos, estudos com o extrato de *Aloe vera* nos folículos ovarianos são limitados e, até o presente momento, não existem estudos sobre o efeito desse composto associado ao meio de cultivo in vitro de folículos ovarianos isolados bovinos.

3. JUSTIFICATIVA

A MOIFOPA fornece informações importantes que envolvem a biologia ovariana, como na elucidação dos mecanismos envolvidos na foliculogênese durante a fase pré-antral podendo em um futuro próximo contribuir na maximização do potencial reprodutivo de fêmeas mamíferas. Entretanto, mesmo com alguns resultados já alcançados, em ruminantes de grande porte, como os bovinos ainda há limitações na produção de oócitos fertilizáveis a partir de folículos pré-antrais. Muitos pesquisadores estão na busca pelo aperfeiçoamento de tal técnica nessa espécie, assim, quando uma vez dominada, esta técnica permitirá ainda a extrapolação para humanos, podendo contribuir na preservação da fertilidade feminina, bem como na restauração da função reprodutiva.

A superprodução de EROS tem sido fator limitante para alcançar oócitos maduros durante o cultivo de gametas femininos. Sabe-se que os danos causados pelas EROS, podem ser reduzidos ou evitados através da suplementação de substâncias antioxidantes ao meio de cultivo, que permitirão o seu desenvolvimento e crescimento durante o cultivo *in vitro*. Neste sentido, a adição de produtos naturais, extratos vegetais, por exemplo, surgem como uma excelente alternativa para potencializar a eficiência de tais processos, esses produtos apresentam em sua composição nutrientes essenciais que denotam inúmeras atividades farmacológicas, dentre elas os com potencial antioxidante que são fatores chaves para atenuar o estresse oxidativo que ocorre durante o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos.

Neste sentido, buscando aprimorar os estudos na MOIFOPA, o extrato de *Aloe vera*, apresenta-se como uma importante alternativa para melhorar a eficiência do meio de cultivo *in vitro*. A interação dos diferentes compostos bioativos presentes no gel mucilaginoso da *Aloe vera* conferem a esta planta atividade antioxidante. Desse modo, dada as características observadas no extrato de *Aloe vera*, possuindo em sua composição substâncias inerentes ao cultivo, justifica-se seu uso como suplemento no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais isolado de bovinos.

4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

A suplementação com o extrato de *Aloe vera* ao meio de cultivo influencia, de forma positiva, o desenvolvimento e a viabilidade de folículos secundários bovinos cultivados in vitro.

A adição do extrato de *Aloe vera* mantém a integridade morfológica após o cultivo in vitro de folículos secundários bovinos.

A adição do extrato de *Aloe vera* como suplemento antioxidante no meio de cultivo aumenta a expressão das enzimas antioxidantes *SOD*, *CAT*, *PRDX6* e *GPXI* em folículos secundários bovinos cultivados in vitro.

5. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar o efeito do extrato de *Aloe vera* no cultivo in vitro de folículos secundários isolados de ovários bovinos.

Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito de diferentes concentrações do extrato de *Aloe vera* (2,5%, 5%, 10% e 20%) sobre o crescimento, morfologia e taxa de formação de antro de folículos secundários bovinos cultivados in vitro por 18 dias.
- Verificar, por meio da análise de microscopia fluorescência (Calceína-AM), o efeito de diferentes concentrações do extrato de *Aloe vera* (2,5%, 5%, 10% e 20%) sobre a viabilidade de folículos secundários bovinos após 18 dias de cultivo in vitro.
- Avaliar o efeito da adição do extrato de *Aloe vera* no meio de cultivo sobre a expressão dos genes de defesa antioxidante *SOD*, *CAT*, *PRDX6* e *GPX1* em folículos secundários bovinos após 18 dias de cultivo in vitro.

2. CAPÍTULO 1

The use of plant extracts in the development of culture medium to in vitro growth of follicles, oocytes and embryos from different species

The use of plant extracts in the development of culture medium to in vitro growth of follicles, oocytes and embryos from different species

Azevedo, V. A. N¹.; Costa, F. C¹.; Silva, J. R. V¹.; Souza, A. L. P¹

¹Laboratory of Biotechnology and Physiology of Reproduction (LABIREP), Federal University of Ceara, Av. Comandante Maurocélío Rocha Ponte 100, CEP 62041-040, Sobral, CE, Brazil.

*Corresponding author at Laboratory of Biotechnology and Physiology of Reproduction, Federal University of Ceará, Sobral, Ceará, Brazil, Av Comandante Maurocélío Rocha Pontes, 100 - Derby, Sobral - CE, 62042-280. Tel. (88) 3611-8000.

E-mail address: analizabatista@gmail.com

Abstract: In vitro culture of ovarian follicles, oocytes, and embryos induces the accumulation of reactive oxygen species (ROS), which negatively impacts the quality of the gametes and embryos. The composition of the culture medium with antioxidant substances has been identified as a key factor to counterbalance the production of oxidants and pro-oxidants molecules. In this context, plant extracts that are constituted of many bioactive substances that can exert an important role in maintaining intracellular homeostasis, generally through their ability to eliminate ROS. Although technical barriers for the processing of plant extracts have limited the wider use of these compounds, recently, the implication of metabolites has aroused interest in the most diverse areas of research, including the in vitro culture of gametes and embryos. Thus, the present review aims to discuss the potential of using plant extracts to supplement culture media for ovarian follicles, oocytes and embryos. In addition, it provides an insight into the perspectives for using plant extracts to the culture gametes and embryos, showing their implications in female reproductive physiology.

Key-words: Antioxidants. Culture media. Plant extract. Oxidative stress. Ovary. Embryo

1. Introduction

The in vitro culture technology is a valuable tool to the development of artificial gametes and embryos, which continuously undergoes improvements through the investigation of new substances to the culture media, contributing to the genetic enhancement, conservation of endangered species and until increases the availability of relevant information that can be extrapolated to human reproduction (ANTONINO et al., 2017, FIGUEIREDO et al., 2018). However, in vitro conditions lead the accumulation of reactive oxygen species (ROS) and the depletion of the antioxidant system, which induces oxidative stress (ANDRADE et al., 2019), responsible for cause molecular injuries (oxidation of carbohydrates and proteins, fragmentation of nucleic acids, peroxidation of lipids and inactivation of antioxidant enzymes). As a consequence, compromises the quality of gametes, embryos and their environment, leading to a negative impact in vitro development (LINS et al., 2017, MALEKI et al., 2014).

ROS inducing factors inherent to in vitro culture, include handling of cell and removal from the tissue, the excessive light exposure, manipulation, oxygen concentrations (20%) and the absence of antioxidant enzymes of the genital tract (SMITH AND ROCHA 2012; SOVERNIGO et al., 2017, SÁ et al., 2018). The culture media with different compositions and supplements exerts a strong influence in control ROS production, once provides the nutrients and factors necessary for different reactions required at each developmental phase of gametes and embryos, besides to maintain the equilibrium of molecules that can limit the success of culture (SANTOS et al., 2018). However, reports have shown that some components present in the commercial culture media can contribute to the generation of ROS (LIN AND WANG, 2020), such as metallic cations (Fe^{2+} and Cu^{2+}), that end up increasing the peroxidative damage of lipids (HASHIMOTO et al., 2000) and the high concentration of glucose ($>20mM$), leads to a reduction in intracellular levels of glutathione (GSH) and impair development competence (GUÉRIN et al., 2001)

Substances with antioxidant action have been added to culture media, as transferrin, selenium and ascorbic acid (BARBERINO et al., 2016, SANTOS et al., 2014). Although an overall positive result has been achieved, the specific indication and the antioxidant with ideal concentration still remains unknown. With this, new studies have been carried in vitro out proposing the use of natural antioxidants, primarily the plant extracts, due to its wide

distribution in nature, beneficial effects and cost in relation to the chemical product (SANTOS et al., 2018, MBEMYA et al., 2018).

Many medicinal plants are part of the group of non-enzymatic antioxidants, having an abundance of bioactive compounds that make them a promising strategy for alternative sources of culture media (MBEMYA et al., 2018). Thus, the aims this review to discuss the consequences of oxidative stress in vitro culture of gametes and embryos, the effect of plant extracts as a supplement to culture media of ovarian follicles (in situ and isolated), oocytes and embryos in mice and domestic animals and provides an insight into the perspective for using plant extracts to gametes and embryos culture, showing their implications in female reproductive physiology.

2. In vitro culture of gametes and embryos and the consequences of oxidative stress

The in vitro culture systems of ovarian follicles have emerged as a technology with the potential to the production of mature oocytes and passable to fertilization (HIRAO, 2011, SONGSASES et al., 2012, SILVA et al., 2015). The maintenance of follicular structure in vitro during growth in a controlled environment can also contribute to understanding the mechanisms that regulate the intimate relation between the oocyte and somatic cells (KREEGER et al., 2005). In addition, it makes it possible to monitor follicular and ovarian alteration in response to many factors during the development of these follicles (GUERREIRO et al., 2016). However, despite advances in this area, the success of follicular culture in vitro is still limited, most reports are restricted to studies that investigate aspects related to the elucidation of early folliculogenesis. As an assisted reproduction technology (ART), this tool has been limited to advancement in mice, the only species to have reported the birth of animals from embryos originating from preantral follicles totally developed in vitro. In large animals, such as cattle or even in humans, follicular development in vitro is still limited (MBEMYA et al., 2017).

One of the reasons for this limitation is that the conditions necessary such as the adequate composition of the culture medium for in vitro growth are not yet well-defined due to limitations in knowledge about follicular dynamics in vivo (MURUVI et al., 2009). For this reason, these technical require standardized protocols, which can it difficult to obtain good results and generate distinct results by different research groups (ARAÚJO et al., 2014). Among the variables that can negatively contribute to the success of in vitro culture of ovarian follicles, oxidative stress generated stands out (AGARWAL et al., 2012).

During *in vitro* culture, oxidative stress is associated with high follicular death rates, which severely compromises the quality of cultured follicles (SAEED-ZIDANE et al., 2017). Among the many known effects of the increased formation of ROS are the peroxidation of lipid membranes, oxidative damage to nucleic acids and carbohydrates, and also the oxidation of sulfhydryl groups in proteins (DORNAS, et al., 2007). These events result in DNA malfunction, loss of membrane integrity, and mitochondrial dysfunction (WU et al., 2011). In addition, oxidative stress can also activate important pro-apoptotic pathways, besides positively regulating the level of expression of pro-apoptotic proteins, thus resulting in impaired follicle structure (HORI et al., 2013). It is also mentioned that the production of lipid peroxidation by-products, such as malondialdehyde (MDA) can cause reactions of these with other cellular components including proteins and nucleic acids, and lead to cell dysfunction (KASHKA et al., 2016, HALLIWELL, 2014).

Several authors have reported significant damage to granulosa cells due to the action of oxidative stress, which can show abnormal growth and loss of function, leading these cells to apoptosis and, consequently, follicular atresia (ZHANG et al., 2016, LI et al., 2016, LEE et al., 2013). Mitochondria are the first organelles to undergo degeneration because is the place where oxygen radicals are produced, thus, the damage caused to these organelles by ROS leads to the degeneration of granulosa cells and a decrease in the quality of the ovarian follicle (SHI et al., 2016). Studies have shown that apoptosis induced by oxidative stress in granulosa cells results in a decrease in estradiol levels and follicular atresia (GHATEBI et al., 2019). It was observed that oxidative stress can interrupt the communication between oocytes and granulosa cells, promoting a decrease in oocyte quality (CHAUBE et al., 2014). Evidence also points out that ROS can induce mitochondrial apoptosis pathways through the activation of death receptors located in cell membranes, thus inducing the mitogen-activating protein kinase and the caspase pathway (CHANDRA et al., 2000). It has been demonstrated that ROS acts up on mitochondria, causing a rupture of mitochondrial membrane potential and the liberation of cytochrome c. Once cytochrome c is in the cytosol, it binds to Apaf-1 and becomes an essential component of the apoptosome. The assembly of the apoptosome complex initiates the caspase cascade by the first activating caspase-9 (TIWARI et al., 2016).

3. Effects of plants extract during the culture of ovarian tissue

The use of natural compounds present in medicinal plants has been considered a

promising strategy and low cost in the quest for alternative substances that can be added to the culture media of ovarian tissues (BARBERINO et al., 2015). Although the ovarian function is a process controlled by hormones secreted essentially by animal cells, as is the case of FSH and other hormones, some substances produced by plant cells can have important effects on ovarian folliculogenesis and steroidogenesis, such as alkaloids, flavonoids, terpenoids and glycosides, present in many types of plants. These molecules act as antioxidants, which is an important property presented in the extracts of these plants (MBEMYA et al., 2017). Previous studies demonstrated that plant secondary metabolites act directly on ovarian cells to eliminate ROS or by acting on several enzymes, such as CAT, SOD and GPX (BARBERINO et al., 2016, JUNG-TAEK et al., 2016). On the other hand, plants also showed their implication during steroidogenesis through their ability to mimic the biological effects of endogenous hormones. These herbal derivatives can act by binding to their nuclear receptor or regulating the activity of essential enzymes in their metabolism (TELEFO et al., 2004).

In this sense, Rocha et al. (2017) demonstrated that resveratrol maintains acceptable parameters of ROS in bovine ovarian tissue in vitro cultured. Resveratrol is a natural polyphenol synthesized by plants as a phytoalexin that becomes activated under stress conditions such as ultraviolet radiation and fungal infection. It can be found in berries, nuts and some medicinal plants, and mainly present in the skin of grapes and thus in red wine (MORITA et al., 2012). As an antioxidant, resveratrol protects mitochondrial function activating the sirtuin-1 gene (SIRT1) found in granulosa cells, cumulus cells, oocytes and blastocysts (WANG et al., 2014, MORITA et al., 2012). Jiang et al. (2019) reported that resveratrol attenuates oxidative stress in the mouse ovary. This effect was verified through the increase in mRNA levels for GPX, SOD2 and CAT, as well as the activity of these important enzymes. It also verified that treatment with resveratrol significantly reduced the levels of MDA and ROS. Another compound that also showed reduced oxidative stress in ovaries in a mouse model was Calligonum extract. Tahmasebi et al. (2018) reported that this plant was able to significantly reduce the formation of ROS in the ovary.

Justicia insularis has also been the subject of important investigations in this regard. It is a herbaceous and perennial plant widely distributed in the tropical area of Africa. Besides alkaloids, glycosides, polyphenols and triterpenoids, the study realized for Goka et al. (2016) revealed the presence of flavonoids in their leaves which act as a natural antioxidant and FSH similar compound. A bibliographic survey showed that several studies

realized with *Justicia* species have revealed the presence of mentioned secondary metabolites (TELEFO et al., 2012, GOKA et al., 2016). Mbemya et al. (2017) demonstrated that extract of this plant added to the culture media of ovarian tissue of sheep, in a concentration-dependent manner, maintained adequate levels of ROS, besides improving follicular survival in vitro and the activation of primordial follicles enclosed in ovarian tissue. Besides FSH 50 ng / ml, the addition with *J. insularis* 0.3 mg/ml promoted beneficial effects on the activation of ovine preantral follicles, at least for the short term. Although the mechanisms of interaction are not clear, these results open a wide field of research on the interactions between the plant extract and FSH in the development of primordial follicles up to the antral stage.

4. Effects of plants extract during the culture of isolated ovarian follicles

The production of physiological antioxidants during the culture of isolated ovarian follicles is not sufficient to prevent oxidative stress (IBRAHIM et al., 2014). Thus, it is necessary to add exogenous antioxidants in the culture medium. In the last years, there has been a growing investigation with plant extracts in the in vitro culture of ovarian follicles. Barberino et al. (2016) showed that the *Amburana cearensis* extract (0.2 mg / mL) stimulated GSH levels and mitochondrial activity in secondary goat follicles. This plant is native to the Caatinga and has in its composition two main compounds, gallic acid and protocatechuic acid (BARBERINO et al., 2015). Protocatechuic acid is a natural phenolic compound that acts in vitro from increasing the expression of antioxidant enzymes such as SOD, eliminating ROS or inhibiting its formation and, thus, reducing the damage from oxidative stress (GUAN et al., 2009). When used as the only antioxidant in the media for ovine secondary follicle culture, protocatechuic acid maintained follicular survival, GSH levels and active mitochondria, in addition to the meiotic competence of DNA development and integrity of cultured oocytes (MENEZES et al., 2017).

Phoenix dactylifera L. is a plant used in traditional medicine by the Chinese and Egyptians to improve fertility in women. The pollen grain of this plant has antioxidant activity due to the presence of phenolic components, such as flavonoids, phenolic acids and phenolic diterpenes (BAHMANPOUR et al., 2013, GABR et al., 2014). A study showed that the pollen grain extract of this plant (20 µg / mL) added to the culture media promoted follicular growth, increased survival and antral formation of murine preantral follicles (ABDOLLAHI et al., 2015). Cavalcante et al. (2017b) showed that the of *Morus nigra*

extract (0.025 mg / ml) in the culture media of secondary sheep follicles increased the levels of GSH in cultured oocytes. This plant is world wide distributed, it can grow in a wide range of climatic, topographic and soil conditions (ALMEIDA et al., 2011). The antioxidant activity of *M. nigra* is attributed to the presence of bioactive compounds, such as rutin, isoquercetin and kaempferitrin, which can act alone or in combination to minimize oxidative damage (CAVALCANTE et al., 2017a). When rutin (0.1 µg / mL) was added as the only antioxidant to the secondary follicle culture media for sheep, it maintained follicular viability and increasing levels of GSH (LINS et al., 2017). A study demonstrated that rutin is a potent flavonoid that eliminates superoxide radicals and chelates of metal ions, which acts to prevent lipid peroxidation (OMOLOU; ROCHA; KADE, 2011).

Mbemya et al. (2018) reported that supplementation of culture medium with *J. Insularis* extract (0.3 mg / mL) showed similar effects to that of FSH after the culture of secondary sheep follicles. The chemical composition of this plant has a phytohormone called trigonelline, which is responsible for having a stimulating effect on folliculogenesis and ovarian steroidogenesis, although more detailed characteristics about the mechanism of action of this substance in granulosa cells are still awaiting further investigations (TELEFO et al., 2012). As an antioxidant, *J. Insularis* maintained high ROS levels, this finding can be attributed to an excess of antioxidants in the culture media, since the basic media was composed of other antioxidant supplements, such as selenium and transferrin. In the murine species, recent research has shown that *Panax ginseng* extract (100 µg / mL) added to the culture media increased follicular growth and survival, secreted hormone levels and decreased ROS levels in cultured oocytes (SEGHINSARA et al., 2019). The main bioactive components of *P. ginseng*, include phenolic acids, tocopherols, policosanols, fatty acids and phytosterols that give this plant to perform both antioxidant and estrogenic activity (XU et al., 2014).

5. Effects of plants extract during the culture of cumulus oocyte complexes

The production of ROS in vitro beyond the physiological range (>80ng/oocyte) can cause damage to the cumulus-oocyte complexes, deteriorating the quality of the oocyte and resulting in low oocyte competence (TAMURA et al., 2020). It is known that standard in vitro culture conditions cause a disequilibrium between oxidants and antioxidants, which leads to an accumulation of ROS, which in turn, induce the destabilization of maturation promoting factor, reduce the survival factors, triggering apoptosis in oocytes from different mammals (KHAZAEI AND AGHAZ, 2017). Thus, the addition of antioxidants to the

culture media can be important to improve IVM rates and reduce injuries caused by the accumulation of ROS (OLIVEIRA et al., 2020). In this context, plant extracts have been gradually used to prove their efficiency against ROS during IVM of female gametes Rajabi-Toustani et al. (2013) demonstrated that *Papaver rhoeas* L. (50µg / mL) extract added to the sheep oocyte maturation media improved the rates of oocytes at MII stage. *P. rhoeas* is an annual herbicide native to Iran and many other regions of the world. Its main bioactive compounds are polyphenols (flavonoids and anthocyanins) that characterize antioxidant activity due to the ability to neutralize free radicals through the extinction of non oxygen radicals or peroxide decomposition (KOSTIC et al., 2010). Moreover, this plant has antioxidant properties related to high Fe²⁺ chelating activity, this heavy metal is responsible for catalyzing the production of the hydroxyl radical that directly affects lipids and promotes oxidative stress (El AND KARAKAYA, 2004). Tavana et al. (2012) demonstrated similar results when of *Crocus sativus* extract (5 µg / mL) was added to the mouse oocyte maturation media. This plant has numerous pharmaceutical properties, most of which are related to its antioxidant activity, which is attributed to the presence of components such as crocins, crocetin, dimethyl crocetin, safranal, flavonoids and anthocyanin pigments (CHAROENSIRI et al., 2009). Anthocyanins react with ROS and neutralize free radicals due to electron deficiency (OKI et al., 2002). Moreover, these molecules stimulate the activation of synthetic -glutamyl and increase the levels of GSH in the culture media (MYHRSTAD et al., 2002). Maleki et al. (2016) showed that addition of crocin (10 µg / ml), a component of *C. sativus*, adding to the oocyte maturation media of mice increased the cytoplasmic maturation rate and the GSH content of MII oocytes after IVM.

Nigella sativa has also been investigated for its attenuators effects of ROS during IVM. This medicinal plant has a potent bioactive constituent, thymoquinone, which gives this plant numerous therapeutic potentials, such as the antioxidant potential (GOYAL et al., 2017). Eini et al. (2020) reported that the hydroalcoholic of *N. sativa* extract can be involved in the induction of antioxidant mechanisms, preventing oxidative stress in vitro. these authors reported that adding 50µg/ml *N. sativa* to IVM media of prepubertal mice with polycystic ovary syndrome increased the rates of oocyte maturation, the levels of intracellular concentration of GSH, the expression of mRNA for peroxidase glutathione, besides to decrease the level of ROS content. Another plant extract that demonstrated a response to oxidative stress in IVM of ovine oocytes was the fenugreek seed extract (*Trigonella foenum graecum* L.). BARAKAT et al. (2018) showed that 10 µg / mL of the extract of this plant improved the maturation rates and increased the levels of intracellular

GSH. The antioxidant action performed from this plant material is due to the presence of several active phytochemicals, including vitamins, flavonoids, terpenoids, carotenoids, coumarins, curcumines, lignin, saponin and sterols, which act in synergy to perform this effect (MOHSENet al., 2012).

The green tea of the *Camellia sinensis* plant is a drink consumed all over the world. Barakat, Himaidi and Rady (2014) reported that the presence of green tea extract (0.3 mg / ml) in IVM media improved in vitro maturation and embryonic development of sheep oocytes up to the blastocyst stage. The polyphenols in green tea are mainly epigallocatechingallate, epicatechin, epicatechin and epigallocatechin. All of these catechins have strong antioxidant effects. Singh et al. (2018) demonstrated that epigallocatechingallate (10 and 15 μ M) adding to the bovine oocyte maturation media showed beneficial effects on in vitro maturation and subsequent in vitro fertilization of bovine oocytes.

6. Effects of plants extract during embryo culture

To optimize the quality of embryos cultured in vitro, studies have proposed improvements to the culture media with the addition of antioxidant supplements. Natural antioxidants, especially of plant origin, have been widely used due to their beneficial effects not only due to their antioxidant activity, but also to their additional beneficial properties and cost benefit (GEON-YEOP et al., 2017, FIDELIS et al., 2020).

Phellodendron amurense and *Humulus japonicus* have been used in traditional medicine in Korea and China, include flavonoids and polyphenolic substances, where they are closely involved in the antioxidant response (WANG et al., 2015, SUNG et al., 2015). According to Geon-Yeop et al. (2017) the of *P. amurense* extracts (0.01 μ g / mL) and *H. japonicus* (0.01 μ g / mL) to the culture media of pre-implanted bovine embryos increased blastocyst rates, decreased ROS levels, caspase-3 expression and apoptotic blastocyst cell rates. Recent research has shown that the plant extract of *Nigella sativa* (50 μ g / ml) promoted an increase in the rates of 2-cell, 8-cell and blastocyst embryos after culturing pre-pubertal mouse embryos (EINI et al., 2020). *Eugenia dysenterica* and *Byrsonima crassifolia* are plants from the Brazilian Cerrado, a biome that has a peculiar climate and is usually affected by intense fires (TAKAO et al., 2015, AMARAL et al., 2015). Studies have reported that these plants can have developed efficient molecular defense mechanisms against ROS, which involve the production of potent antioxidant compounds such as

catechin, quercetin, epicatechin, ellagic acid, anthocyanins and carotenoids, among other bioactive substances (SIQUIERA et al., 2013, PRADO et al., 2014). Fidelis et al. (2020), demonstrated that the of *E. dysenterica* extracts (0.01mg / ml) and *B. crassifolia* (0.01mg / ml) added to the culture media did not affect the development of pre-implanted bovine embryos. *E. dysenterica* increased rates of cleavage and blastocysts and decreased rates of apoptotic cells. Regarding the antioxidant response, both plant extracts increased the levels of transcripts involved in the metabolism of ROS, such as the endogenous antioxidant enzymes GPX4 and PRDX3. The ethanolic of *B. crassifolia* extract increased the expression of these genes, but reduced the proportion of apoptotic cells.

7. Perspectives of using plants extract to supplement culture media of gametes and embryos

The use of natural extracts derived of plants has been considered a promising strategy in several areas, including the culture of gametes and embryos and, currently, many chemical analyzes have been carried out on plant extracts to identify and characterize their components, as well as its mechanisms of action on diverse biological systems (HARVEY et al., 2015). In this sense, several properties of these compounds have been described, for example, antimicrobial and anti-inflammatory activity and, even, the ability to mimic the biological effects of endogenous hormones when binding to their nuclear receptor or even regulating the activities of enzymes- key to its metabolisms, such as cytochrome P450 and 17- β - hydroxysteroid dehydrogenase, which is a key enzyme of steroidogenesis (KURZER AND XU, 1997). However, the best described property of these extracts is the ability to act as antioxidants, this characteristic being especially important in the culture of gametes and embryos and, for this reason, it has the greatest potential to be better explored and understood in the coming years (MBEMYA et al., 2017). In several reports of new drug discoveries, many plant extracts show antioxidant activity. Plant metabolites have served as inspiration for many researchers. Although previously, technical barriers for screening plant products have limited the wider use of these compounds, more recently there has been a resurgence of intense interest in plant metabolites in the most diverse areas of research, including in vitro culture of gametes and embryos (POHL AND LIN, 2018). For example, Barberino et al. (2015) and Lins et al. (2017) described that the extract of *A. cearensis* and rutin, respectively, demonstrated a positive effect on GSH levels in ovine and caprine ovarian follicles. Rocha et al. (2018) demonstrated that resveratrol was able to maintain

acceptable parameters of ROS in bovine ovarian tissue. In addition to these reports, the *Aloe vera* plant has been demonstrating its antioxidant potential.

In fact, *A. vera* extract can modulate oxidative stress due to the presence of antioxidant compounds, like α -tocopherol (vitamin E), carotenoids, ascorbic acid (vitamin C), flavonoids and tannins (CESAR et al., 2018). Sumi et al. (2019) reported that *A. vera* increases the activity of antioxidant enzymes, such as catalase, superoxide dismutase and glutathione. The protective effect of *A. vera* on ECM integrity has also been reported (SAIATO et al., 2016, CHUL-HONG et al., 2017). Acemannan, a beta-(1,4)-acetylated mannan, is a bioactive polysaccharide present in *A. vera* gel that promotes skin wound healing through activating AKT/mTOR-mediated protein translation mechanism in fibroblasts, resulting in increased secretion of collagen in vivo (XING et al., 2015).

Increase in the use of these components is due to advances in the establishment of techniques for improved fractionation, isolation, mass spectrometry, among others, which have enabled the optimization of prospecting and characterization protocols for these compounds (MARHUR AND HOSKINS, 2017). These technical advances will allow, increasingly, popularizing the use of these substances for the most diverse biotechnological purposes.

It is also important to consider that, in the in vitro culture of gametes and embryos, the development of standardized protocols that establish well-defined compositions for the culture media can, in the near future, make the results obtained with the technique increasingly effective. This more precise definition of the culture media, however, depends not only on understanding the properties of the supplements that are added to it, but, above all, on the more thorough elucidation of the ovarian physiology itself, which has been achieved with relative success in recent years. In conjunction with this, accumulated acquirements about the properties exhibited by plant extracts have contributed significantly to establish in vitro culture media.

8. Final considerations

In vitro culture of ovarian follicles, oocytes and embryos induces high and unbalanced levels of intracellular ROS. The resulting oxidative stress has a negative impact on development, being one of the main factors that limits the results of culture. In fact, supplementation with antioxidants substances in the culture medium is the main strategy to mitigate oxidative stress. Research aimed at establishing this type of supplement is essential. Plant extracts have been shown to be a viable alternative. Although with results, in many

cases, still inconclusive or different among the research groups, many promising results have been achieved until now. It is important consider that divergent results can be associated with significant differences in the sample pre-treatment, form of extraction, type of culture, evaluation methods, among other individual variations inherent to each experimental protocol. Finally, further studies should be carried out to better understand the mechanisms of action of plant extracts about the redox biology in folliculogenesis and embryo development, which can help to reduce costs and improve the results of in vitro culture.

References

- ABDOLLAHI, F.S. et al. Effect of *Phoenix dactylifera* pollen grain on maturation of preantral follicles in NMRI mice. **J Herb med Pharmacol**, v.4, p. 93-97, 2015.
- AGARWAL, A. et al. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. **Reprod. Biol. Endocrinol**, v.10, n.49, 2012.
- ALMEIDA, J. R. G. S. et al. Evaluation of hypoglycemic potential and pre-clinical toxicology of *Morus nigra* L. (Moraceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v.30, p.96–100, 2011.
- ALPINAR, K. et al. Antioxidant capabilities of some food plants grown wildly in Ayvalik in Turkey. **Food Sci Technol Res**, v.15, p.59–64, 2009.
- AMARAL, L. F. et al. The supercritical CO₂ extract of *Caryocar brasiliense* has antimicrobial and antioxidant properties useful for personal care products **BMC Complement Altern Med**, v.14, 2014.
- ANDRADE, G. M. et al. Oxygen tension modulates extracellular vesicles and its miRNA contents in bovine embryo culture media. **Mol Reprod Dev**, v. 86, n.8, p.1067-1080, 2019.
- ANTONINO, D. C. et al. Three-dimensional levitation culture improves in-vitro growth of secondary follicles in bovine model. **Reproductive Bio Medicine Online**, v. 38, 2019.
- ARAÚJO, V. R. et al. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. **Reprod Biol Endocrinol**, v.13, n.12, p.78, 2014.
- AZADEH, A.; LEILA, R. Effect of *Gundelia tournefortii* leaves extract on in immature mouse oocytes. **Journal of Herbal Drugs**, v.5, n. 2, p.84-89, 2014.
- BAHMANPOUR, S. et al. Effects of date palm (*Phoenix dactylifera*) gemmule extract on morphometric parameters of reproductive tissues, hormones and sperm quality in rat. **Anatomical Sciences**, v.10, n.3, p.144-150, 2013.
- BAKURADZE, T. et al. Antioxidant effectiveness of coffee extracts and selected constituents in cell-free systems and human colon cell lines. **Mol Nutr Food Res**, v.54, p.1734–1743, 2010.

- BARAKAT, I. A. et al. Gene expression and maturation evaluation of sheep oocytes cultured in media supplemented with natural antioxidant source. **South African Journal of Animal Science**, v. 48, n. 2, 2018.
- BARAKAT, I. A. H.; AL-HIMAIDI, A. R.; RADY, A. M. Antioxidant Effect of Green Tea Leaves Extract on In-vitro Production of Sheep Embryos. **Pakistan Journal of Zoology**, v.46,n.1, p.167-75, 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, 2016.
- CAVALCANTE, A. Y. P. et al. Effect of ovarian tissue storage in *Morus nigra* extract on the morphology and DNA fragmentation of ovine preantral follicles. **Semina: Ciências Agrárias**, v.38, p.1973, 2017b.
- CAVALCANTE, A. Y. P. et al. Supplemented *Morus nigra* extract-based media associated with FSH enables the survival and growth of isolated ovine secondary ovarian follicles. **Reprod Domest Anim**, v. 53, n.2, p.423-432, 2017a.
- 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, n.10, p.125, 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.
- CHAROENSIRI, R. et al. Beta-carotene, lycopene and alpha-tocopherol contents of selected fruits from Thailand. **Food Chem**, v.113, p.202-207, 2009.
- CHAUBE, S.K. et al. Clomiphene citrate induces ROS-mediated apoptosis in mammalian oocytes. **Open J Apoptosis**, v.3, p.52-58, 2014.
- CHOI, E. M. Kaempferol protects MC3T3-E1 cells through antioxidant effect and regulation of mitochondrial function. **Food Chem Toxicol**, v. 49, p.1800-1805, 2011.
- 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, n.1, p. 2110-2115, 2017.
- DORNAS, W. C. et al. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Rev. Ciên.Farm. Básica Apl.**, v. 28, n. 3, p. 241-249, 2007.
- EINI, F. et al. Improvement in epigenetic modification and developmental competence in oocytes of PCOS mice by the hydroalcoholic extract of *Nigella sativa* during maturation in vitro: an experimental study. **International Journal of Reproductive Biomedicine**, v. 18,n.9, p.733-746, 2020.
- EL, S. N.; KARAKAYA, S. Radical iron chelation and elimination activities for some vegetables used as traditional dishes in the Mediterranean diet. **Int J Food**

SciNutr, v.55, p.67–74. 2004.

ELHAM, M. M. et al. A comparative study of saffron aqueous extract and its active ingredient, crocin on the in vitro maturation, in vitro fertilization, and in vitro culture of mouse oocytes, **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 53, p.21-25, 2014.

ELKERM, Y.; TAWASHI, R. Date palm pollen as a preventative intervention in radiation-and chemotherapy-induced oral mucositis: A pilot study. **Integr Cancer Ther**, v.13, n.6, p.468-472, 2014.

FIDELIS, A. A. G. et al. Ethanol Extract of Dry Leaves from the Cerrado Biome Increases the Cryotolerance of Bovine Embryos Produced In Vitro. **Oxid Med Cell Longev**, 2020.

FIGUEIREDO, J. R.; LIMA, L. F.; SILVA, J. R.; SANTOS, R. R Control of growth and development of preantral follicle: insights from in vitro culture. **Animal Reproduction**, v.15, Supl.1, p.648-659, 2018.

GABR, G. A. et al. The potential protective activity of date palm (*Phoenix dactylifera*) pollen and *Panax ginseng* against cisplatin-induced testicular toxicity in rats. **International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences**, v.3, n.5, p.605-623, 2014.

GEON-YEOP, D. et al. Native plants (*Phellodendron amurense* and *Humulus japonicus*) extracts act as antioxidants to support developmental competence of bovine blastocysts. **Asian-Australas J AnimSci**, v. 30, n. 9, p.1245-1252, September 2017.

GHATEBI, M. Implications from early life stress on the development of mouse ovarian follicles: Focus on oxidative stress. **The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v.45, p.1506-1514, 2019.

GOKA M.S.C. et al. Potentialisation of Pregnant Mare Serum Gonadotropin Inducing Effect on Ovarian Follicles Growth by the Aqueous Extract of *Aloe buettneri*, *Dicliptera verticillata*, *Hibiscus macranthus* and *Justicia insularis* Leaves in Immature Rats. **Pharmacology**, v.7, p.328–336, 2016.

GOYAL, S. N. al. Potencial terapêutico e desenvolvimento farmacêutico da timoquinona: Uma molécula multi-targeted de origem natural. **Front Pharmacol**, v. 8, p. 656–674, 2017.

GUAN, S. et al. Protocatechuic acid promotes cell proliferation and reduces basal apoptosis in cultured neural stem cells. **Toxicol in Vitro**, v. 23, p. 201 - 208 2009.

GUÉRIN, P.; EL, M. S.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Hum. Reprod. Update**, v.7, p. 175–189, 2001.

GUERREIRO, D. D. et al. In situ cultured preantral follicles is a useful model to evaluate the effect of anticancer drugs on caprine folliculogenesis. **Microscopy Research and Technique**, v.79, n.8, p.773-81, 2016.

- HALLIWELL, B. Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: avoiding pitfalls. **BiomedJ.**, v. 37, n. 3, p. 99-105, 2014.
- HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R.J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nat Rev Drug Discov**, v.14, p.111–129, 2015.
- HASHIMOTO, S. et al. Low oxygen tension during in vitro maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus-oocyte complexes. **Mol Reprod Dev**, v.57, p.353–360, 2000.
- HIRAO, Y. Conditions affecting growth and developmental competence of mammalian oocytes in vitro. **Animal Science Journal**, v.82, p. 187-197, 2011.
- HORI, Y. S. et al. Regulation of FOXOs and p53 by SIRT1 Modulators under Oxidative Stress. **Plos One**, v.8, n.9, 2013.
- IBRAHIM, M. A. A. et al. Effects of maternal malnutrition during lactation on the prostate of rats off spring at puberty: a histological, immunohistochemical and morphometric study. **Egypt J Histol**, v.37, p.710-719, 2014.
- JIANG, Yu et al. Resveratrol Plays a Protective Role against Premature Ovarian Failure and Prompts Female Germline Stem Cell Survival. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 14, 23 Jul. 2019.
- JUNG-TAEK, K. et al. Effect of antioxidant flavonoids (quercetin and taxifolin) on in vitro maturation of porcine oocytes. **Asian Australas J Anim Sci**, v.29, p. 352-358, 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**, v. 62, n. 6, p.404-414, 2016.
- KHAZAEI, M.; AGHAZ, F. Generation of reactive oxygen species and use of antioxidants during in vitro maturation of oocytes. **Int J Fertil Steril**, v.11, n.2, p. 63-70, 2017.
- KOSTIC, D.A. et al. Phenolic contents antioxidant and antimicrobial activity of *Papaver rhoeas* L. extracts from Southeast Serbia. **J. Med. Plant. Res**, v.4, p.1727–1732, 2010.
- KREEGER, P. K. et al. Regulation of mouse follicle development by follicle-stimulating hormone in a three-dimensional in vitro culture system is dependent on follicle stage and dose. **Biol Reprod**, v.73, n.5, p.942-50, 2005.
- KURZER, M.S.; XU, X. Dietary phytoestrogens. **Annu. Rev Nutr**, v.17, p.353-381, 1997.
- 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, D. et al. The chronic effects of lignin-derived bisphenol and bisphenol A in Japanese medaka *Oryzias latipes*. **Aquat Toxicol**, v.170, p.199-207, 2016.
- LIN, J.; WANG, L. Oxidative stress in the development of oocytes and embryos: implications for in vitro systems. **Antioxidants and Redox Signaling**, 2020.
- LINS, T. L. B. G. et al. Rutin can replace the use of three other antioxidants in the culture media, maintaining the viability of sheep isolated secondary follicles. **Theriogenology**, v. 89, p. 263–70, 2017.
- MALEKI, E. M. et al. Effects of Crocin Supplementation during In Vitro Maturation of Mouse Oocytes on Glutathione Synthesis and Cytoplasmic Maturation. **Int J Fertil Steril**, v.10, n.1, p. 53-61, 2016.
- MALEKI, M. E. et al. A comparative study of saffron aqueous extract and its active ingredient, crocin on the in vitro maturation, in vitro fertilization, and in vitro culture of mouse oocytes. **Taiwan. J. Obstet. Gynecol**, v. 53, n.1, p.21–25, 2014.
- MATHUR, S., HOSKINS, C., 2017. Drug development: Lessons from nature. **Biomed. Rep**, v.6, n.6, p.612-614.
- MBEMYA, G. T. et al. Supplementation of in vitro culture media with FSH to grow follicles and mature oocytes can be replaced by extracts of *Justicia insularis*. **PLoS one**, v. 13, n. 12, 2018.
- MBEMYA, G.T. et al. *Justicia insularis* improves the in vitro survival and development of ovine preantral follicles enclosed in ovarian tissue. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.5, p. 668-680, 2017b.
- MBEMYA, G.T. et al. Reports on vivo and in vitro contribution of medicinal plants to improve the female reproductive function. **Reprodução and Climatério**, v. 32, n.1, p. 109-119, 2017a.
- MENEZES, V. G. et al. Use of protocatechuic acid as the sole antioxidant in the base medium for in vitro culture of ovine isolated secondary follicles. **Reproduction in Domestic Animals**, v.52, p.890-898, 2017.
- MOGHADAM, F.D. et al. Effect of *Holothuria leucospilota* extracted saponin on maturation of mouse oocyte and granulosa cells. **Res PharmaSci**, v. 13, p. 1-7, 2016.
- MOHSEN, A.; HASSAN, R.; TINA, B. Physiological and drug effect of fenacho: A review. **IOSR J. Pharm**, v.2, p.49-53, 2012.
- 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, n.14, 2012.
- MURUVI, W. et al. In vitro Growth and Differentiation of Primary Follicles Isolated from Cryopreserved Sheep Ovarian Tissue. **Anim. Reprod. Sci**, v.112, p.36-50, 2009.

MYHRSTAD, M. C. W. et al. Flavonoids increase the level of intracellular glutathione by transactivating the [gamma]-glutamylcysteine synthetase catalytic subunit promoter. **Livre Radic Biol Med**, v.32, p.386–393, 2002.

MYHRSTAD, M.C.W. et al. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the γ -glutamylcysteine synthetase catalytic subunit promoter. **Free Radical Biology and Medicine**, v.32, n.5, p.386-393, 2002.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **J. Nat. Prod.** v.79, p.629–661, 2016.

OKI, T. et al. Involvement of anthocyanins and other phenolic compounds in the radical scavenging activity of purple-fleshed sweet potato cultivars. **J Food Sci**, v.67, p.1752–1756, 2002.

OLIVEIRA, C. T. et al. Oxidative Stress in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Pathophysiology and Opportunities for Pharmacological Intervention. **Oxid Med Cell Longev.** 2020.

OMOLOU, P. A.; ROCHA, J. B. T.; KADE, I. J. Attachment of rhamnosyl glucoside on quercetin confers potent iron-chelating ability on its antioxidant properties. **Exp Toxicol Pathol**, v. 63, p.249–255, 2011.

POHL, F.; LIN, P.K.T. The Potential Use of Plant Natural Products and Plant Extracts with Antioxidant Properties for the Prevention/Treatment of Neurodegenerative Diseases: In Vitro, In Vivo and Clinical Trials. **Molecules**, v. 23, n.12, 2018.

PRADO, L. C. et al. The gastroprotective effects of *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) leaf extract: the possible role of condensed tannins. **Biol Pharm Bull**, v. 37, n.5, p.722-30, 2014.

RAJABI-TOUSTANI, R. et al. Effect of *Papaver rhoeas* L. extract on in vitro maturation of sheep oocytes. **Small Rumin Res**, v.114, p. 146 – 151, 2013.

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

ROSSETTO, R. et al. Effect of media composition on in vitro cultivation of bovine pre-antral follicles: morphology and viability do not guarantee functionality. **Zygote**, v.21, n.2, p.125-8, 2013.

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, p.7129, 2018.

SAEED-ZIDANE, M. et al. Cellular and exosome mediated molecular defense mechanism in bovine granulosa cells exposed to oxidative stress. **Plos One**, v. 12, n.11, 2017.

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. **Biosci Biotechnol Biochem**, v.80, n.7, p.1416-24, 2016.

SANTOS, A. L. et al. The Good, the Bad, and the Ugly of ROS: New Insights on Aging and Aging-Related Diseases from Eukaryotic and Prokaryotic Model Organisms. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2018.

SANTOS, L. P. et al. Protein localization of epidermal growth factor in sheep ovaries and improvement of follicle survival and antrum formation in vitro. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, p.783, 2014.

SEGHINSARA, M.A. et al. *Panax ginseng* extract Improves Follicular Development after Mouse Preantral Follicle 3D Culture. **Cell J**, v. 21, n.2, p.210-219, 2019.

SHI, L. et al. Long-Term Moderate Oxidative Stress Decreased Ovarian Reproductive Function by Reducing Follicle Quality and Progesterone Production. **PLoS one**, v.11, n.9, 2016.

SILVA, G. M. et al. In vitro development of secondary follicles from pre-pubertal and adult goats cultured in two-dimensional or three-dimensional systems. **Zygote**, v.23, p. 475–484, 2015.

SINGH, L. W. et al. Antioxidant effect of Epigallocatechingallate on bovine IVM and IVF. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 6, n.4, p. 401-403, 2018.

SIQUEIRA, E. M. et al. The fruits of the Brazilian savannah contain a higher content of bioactive compounds and a greater antioxidant activity compared to conventional red delicious apples. **PLoS One**, v.8, n.8, 2013.

SMITH, G. D.; MONTEIRO, R. A. Advances in embryo culture systems. **Semin Reprod Med**, v.30, n.3, p.214-21. 2012.

SONGSASEN, N. et al. In vitro growth and steroidogenesis of dog follicles are influenced by the physical and hormonal microenvironment. **Reproduction**, v.142, p.113–122, 2011.

SOVERNIGO, T. C. et al. Effects of supplementation of medium with different antioxidants during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. **Reproduction Domestic Animals**, v. 52, n. 4, p. 561-569, 2017.

SUNG, B. et al. The extract of *Humulus japonicus* exhibits antioxidant and anti-aging effects by modulating the AMPK-SIRT1 pathway. **Exp Ther Med**, v.9, n.5, p.1819-1826, 2015.

SWAIN, J.E. et al. Microdrop preparation factors influence culture-media osmolality, which can impair mouse embryo preimplantation development. **Reprod Bio Med Online**, v.21, p.142–147, 2011.

TAHMASEBI, F.; MOVAHEDIN, M.; MAZAHERI, Z. Antioxidant effects of *Calligonum* extract on ovarian tissue of PCO model: An experimental study. **Int J Reprod Biomed**, v.16, n.10, p.641-648, 2018.

TAKAO, L. K.; IMATOMI, M.; GUALTIERI, S. C. Antioxidant activity and phenolic content of leaf infusions of species of *Myrtaceae* from Cerrado (Cerrado). **Braz J Biol**, v.75, n.4, p.948-52, 2015.

TAMURA, H. et al. Importance of Melatonin in Assisted Reproductive Technology and Ovarian Aging. **Jornal Internacional de Ciências Moleculares**, v. 21, n.3, p.1135, 2020.

TAVANA, S. et al. Effects of aqueous saffron extract (*Crocus sativus* L.) on in vitro maturation, fertilization and embryonic development of mouse oocytes. **J célula**, v.13, n.4, p.259-264, 2012.

TELEFO, P. B. et al. Effect of the aqueous extract of *Justicia insularis* T. Anders (acanthaceae) on ovarian folliculogenesis and fertility of female rats. **Afr. J. Tradit. Complement**, v. 9, p.197-203, 2012.

TELEFO, P.B.; MOUNDIPA, P.F.; TCHOUANGUEP, F.M. Inductive effects of the leaf mixture extract of *Aloe buettneri*, *Justicia insularis*, *Dicliptera verticillata* and *Hibiscus macranthus* on in vitro production of oestradiol. **J Ethnopharmacol**, v.90, p. 225-230, 2004.

TIWARI, M. et al. Involvement of reactive oxygen species in meiotic cell cycle regulation and apoptosis in mammalian oocytes. **Reactive Oxygen Species**, v.1, p.110–116, 2016.

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.

WANG, W. et al. Ultrasonic-assisted ionic liquid-aqueous extraction of three types of *Phellodendron murense* Rupr alkaloids and optimized conditions of response surface use. **Ultrason Sonochem**, v.24, p. 13-18, 2015.

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.

XING, W. et al. Acemannan accelerates cell proliferation and skin wound healing through AKT/mTOR signaling pathway. **Journal of Dermatological Science**, v. 79 p. 101–109, 2015.

XU, Y. et al. Treatment with *Panax ginseng* antagonizes the estrogen decline in ovariectomized mice. **Int J Mol Sci**, v.15, n.5, p.7827-7840, 2014.

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**, 2016.

7. CAPÍTULO 2

Effects of *Aloe vera* on growth, viability and gene expression in bovine secondary follicles cultured *in vitro*

Effects of *Aloe vera* on growth, viability and gene expression in bovine secondary follicles cultured *in vitro*

V. A. N. Azevedo¹, P. A. A. Barroso¹, E. M. Vasconcelos², F. C. Costa¹, E. I. T. Assis¹, B.R. Silva¹, L. R. M. Paulino¹, A. W. B. Silva¹, J. R. V. Silva¹, A. L. P. Souza¹ *

¹Laboratory of Biotechnology and Physiology of Reproduction (LABIREP), Federal University of Ceara, Sobral, CE, Brazil.

²Laboratory of Media Preparation and In vitro Production of Embryos, Federal University

*Corresponding author: A. L. P. Souza: Federal University of Ceara, Av. Comandante Mauricélio Rocha Ponte 100, CEP 62041 040, Sobral, CE, Brazil. Phone / Fax: +55 8836118000 [analizabatista@gmail.com]

Abstract: This study aimed to investigate the effects of *Aloe vera* extract on growth, morphology, antrum formation and follicular viability, as well as on mRNA levels for *SOD*, *CAT*, *GPXI* and *PRDX6* in bovine secondary follicles cultured in vitro. To this end, ovaries of multiparous cows were obtained from a local slaughterhouse and the follicles were isolated from the ovarian cortex. The follicles individually cultured at 38.5°C, with 5% CO₂ in air, for 18 days in TCM-199⁺ alone or supplemented with different concentrations of *Aloe vera* extract (2.5, 5.0, 10.0 and 20.0%). Follicular growth (diameter and daily growth), morphology and antrum formation were evaluated every 6 days. Analysis of viability (calcein and ethidium homodimer-1) and mRNA levels for *SOD*, *CAT*, *GPXI* and *PRDX6*, by real-time PCR were evaluated after culture. Follicular diameters, daily growth rate and mRNA levels in follicles cultured in vitro were compared using Kolmogorov-Smirnov test and Kruskal-Wallis test, the Student's t-test was used to compare the viability, while follicular survival and antrum formation were compared using the chi-squared test ($P < 0.05$). The results showed that *Aloe vera* maintained follicular morphology similar to the control group. Follicles cultured the presence of *Aloe vera* showed a progressive increase in follicular diameter until the 12 day of culture. An increase in daily growth rate was observed from day 0 to day 6 in treatment with 5.0% *Aloe vera* when compared to the control group. Follicles cultured with

2.5% *Aloe vera* had higher rate of antrum formation than those cultured in the control group. Regarding viability, follicles cultured with 2.5 and 5.0% *Aloe vera* showed a higher viability rate than follicles cultured in control medium. The presence of 2.5, 5.0 and 20.0% *Aloe vera* in the culture medium maintained the levels of mRNA for SOD, CAT and PRDX6 in follicles similar to the control group. In conclusion, 2.5% *Aloe vera* maintains the expression of mRNA for SOD and PRDX6 in secondary follicles grown in vitro for 18 days, promotes of antrum formation and increases viability of follicle after culture.

Keywords: Plants extract. Secondary follicle. Antioxidant. Cow. In vitro culture

1. Introduction

In vitro culture of preantral follicles has contributed to elucidation of mechanisms involved in early folliculogenesis and opens new perspectives to maximize reproductive potential of different species, such as cattle, by increasing the availability of potentially fertilizable oocytes (FIGUEIREDO et al., 2019, DONFACK et al., 2018, CADENAS et al., 2018). However, external factors such as exposure to high concentrations of oxygen, light, follicle manipulation and absence of physiological protection mechanisms during in vitro culture can result in accumulation of reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress (SÁ et al., 2018, ANDRADE et al., 2019). Such imbalance redox in vitro can cause the oxidation of carbohydrates and proteins, fragmentation of nucleic acids, lipid peroxidation and damage to mitochondria (CHAPPEL, 2013, MORAIS et al., 2019). In addition, it can inactivate enzymes responsible for antioxidant defense, such as glutathione (GSH), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and peroxiredoxins (PRDX) that act physiologically to balance cellular homeostasis (SOVERNIGO et al., 2017). Thus, the culture medium need to be supplemented with antioxidant substances to protect the cells against free radicals (KHAN et al., 2018, SEGHINSARA et al., 2019). Antioxidant substances can be of natural or artificial origin, and act by binding to free radicals (superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radical) to neutralize their destructive properties (SEGHINSARA et al., 2019). Some commercially purified products, such as ascorbic acid, transferrin and selenium are routinely added to the culture media as antioxidant supplements (CUNHA et al., 2018). However, other substances of plant origin, with proven antioxidant activity have been extensively explored during in vitro culture of ovarian follicle, given their wide beneficial effects and distribution in nature, is the case of *Amburana cearensis* (BARBERINO et al., 2016), *Justicia insularis* (MBEMYA et al.,

2018) *Morus nigra* (CAVALCANTE et al., 2018) that have presenting beneficial effects on follicles cultured in vitro.

Among the extract of plants with potential to eliminate free radicals, *Aloe vera* has different bioactive compounds, such as α -tocopherol, carotenoids, ascorbic acid, tannins, flavonoids have potential to eliminate ROS during in vitro culture of ovarian follicles. This action can be attributed to synergy between these compounds that can act as effective coadjuvants to maintain cellular redox status (RADHA AND LAXMIPRIYA, 2015, CESAR et al., 2018). In vitro studies have already reported the efficiency of *Aloe vera* gel in eliminating various free radicals (CESAR et al., 2018). In rat liver mitochondria, the *Aloe vera* gel modulated oxidative status by eliminating different superoxide anions (YAGI et al., 2002). Haritha et al. (2014) reported that *Aloe vera* reduced highly reactive ROS that cause extensive damage to cell membrane lipids of sperm cells (BEHMANESH et al., 2018). In a recent investigation, *Aloe vera* extract positively regulated the expression of SOD2 and CAT enzymes in human corneal epithelial cells in vitro cultured (CEVAROLO et al., 2021). Sumi et al. (2019) demonstrated the *Aloe vera* gel increased the activity of antioxidant enzymes, such as CAT and SOD, in addition to increasing GSH in cardiac tissue of rats. Simultaneously, a significant decrease in malondialdehyde (MDA) was also observed. However, it is still not known if *Aloe vera* extract can regulate the levels of mRNAs for antioxidant enzymes in bovine secondary follicles and if it has beneficial effects on growth and viability of these follicles during in vitro culture.

The aim of this study was to evaluate the effects of different concentrations of *Aloe vera* gel (2.5, 5.0, 10.0 or 20.0%) on morphology, growth, antrum formation and follicular viability, as well as on mRNA levels for *SOD*, *CAT*, *PRDX6* and *GPX1* in bovine secondary follicles after 18 days of in vitro culture.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

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

2.2. Aloe vera extract isolation

Aloe vera was cultured in a region with coordinates 03°40'54.7"S, 40°20'13.6"W,

temperature ranging from 29.1°C to 30.1°C, and semi-arid tropical climate (INMET, 2018). To obtain the mucilaginous gel, the leaves in intermediate stage of maturation were collected in the morning. In the laboratory, the leaves were washed in distilled water and with the aid of a sterile blade, the outer part was removed to expose the viscous and colorless mucilaginous parenchyma or gel. Then, by smooth movements with a spatula, the gel was passed through a sieve and collected in a sterile container, then the gel was filtered in 45µm nylon filter (Millipore®, Cork, Ireland) and stored at 4°C (SOUZA et al., 2016).

2.3. Ovarian Collection

Ovaries of multiparous cows (n = 50) were collected at a local slaughterhouse (Sobral, Ceará, Brazil) after official administration permission to use the ovaries for research purposes. Immediately after death, the ovaries were washed with 70% ethanol for approximately 10 s, followed by two washes in TCM-199 supplemented with penicillin (100mg/ml) and streptomycin (100 mg/ml) and buffered with HEPES. The ovaries were transported in 1 h to the laboratory in TCM-199 at 4 ° C (PAULINO et al., 2018). This study was registered in the Committee Ethics and Animal Welfare of the Federal University of Ceará (N° 04/2019).

2.4. Follicle isolation and in vitro culture

In the laboratory, the ovarian cortex was fragmented (1-2mm) with a sterile scalpel blade and fragments of the ovarian tissue were placed in TCM-199 medium supplemented with penicillin (100mg/ml) and streptomycin (100mg/ml) and buffered with HEPES. Secondary follicles measuring 150 to 250µm in diameter were manually isolated with the aid of 26 gauge needles with the aid of a stereomicroscope (SMZ 645 Nikon, Tokyo, Japan). After isolation, follicles containing a visible oocyte surrounded by granulosa cells, an intact basement membrane, and without the presence of an antral cavity were selected for culture (PAULINO et al., 2018, 2020). The follicles were individually cultured in 100µl drops of culture medium in Petri dishes (60×15mm; Corning, USA). The control medium, identified as TCM-199⁺, consisted of TCM - 199 (pH 7.2-7.4) supplemented with 3.0mg / ml bovine serum albumin (BSA), 100IU penicillin/streptomycin, 10µg/ml insulin, 5.5µg/ml transferrin and 5ng/ml selenium (ITS), 50µg/ml ascorbic, 100ng/ml FSH, 2mM glutamine and 2mM hypoxanthine. The follicles were randomly distributed and cultured in TCM-199 alone or supplemented with 2.5, 5.0, 10.0 or 20.0% *Aloe vera* extract. The concentrations of *Aloe vera* extract were defined according to a pilot experiment. In each treatment, approximately 100 follicles were cultured. The culture was carried out in a humidified

incubator at 38.5°C with 5% CO₂ in air for 18 days. Every two days of culture, 60µ L of medium was renewed maintaining the same initial concentration for each treatment

2.5. Assessment of preantral follicle morphology, growth antrum formation

Follicles were evaluated every 6 days of culture using an inverted microscope (Nikon, Eclipse, TS 100, Japan) and an image capture system (NIS Elements 2.4 Software, Nikon Instruments Inc., Japan). Follicles with well-organized granulosa cells, and intact oocyte and basement membrane were considered normal; and those containing an opaque and/or extruded oocyte and having opaque granulosa cells were considered degenerated (VASCONCELOS et al., 2021). The presence of an antral cavity was recorded as a visible translucent cavity within the granulosa cell layers. The follicular diameter was measured only in morphologically normal follicles. The average of two perpendicular measurements from the outer layer of theca cells was reported as follicular diameter (µm). All evaluation and measurements were made by the same operator.

2.6. Assessment of preantral follicles viability by fluorescence microscopy

After culture, follicles (n = 20 / treatment) were incubated in 100µl droplets of TCM-199 medium containing 4mM calcein-AM and 2mM ethidium homodimer-1 (Molecular Probes - LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells - L3224, Invitrogen, Karlsruhe, Germany) at 37°C for a period of 15 minutes. The follicles were then washed three times in TCM-199 medium and then examined under a fluorescence microscope (Nikon, Eclipse, TS100, Japan). Oocytes and granulosa cells were considered viable if the cytoplasm was positively stained with calcein AM (green) and unviable if the chromatin was positively labeled with ethidium homodimer-1 (red) (VAN DEN HURK et al., 1998). The fluorescence intensity was analyzed using Image J software (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

2.7. Expression of mRNA for SOD, CAT, PRDX6 and GPX1 in cultured follicles

Normal follicles that had been cultured for 18 days in each treatment were collected and then stored at -80°C until extraction of total RNA for further analysis of the levels of mRNA for *SOD*, *CAT*, *PRDX6* and *GPX1*. Total RNA extraction 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 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 $\Delta\Delta$ Ct method was used to transform the Ct values into mRNA expression levels (LIVAK AND SCHMITTGEN, 2001).

Table 1. Primer pairs used for real-time PCR.

Sense (S)	Primer sequence(5'→3')	Sense (S) Anti-sense (As)	GenBank accession no.
GAPDH	TGTTTGTGATGGGCGTGAACCAATG GCGCGTGGACAGTGGTCATAA	S AS	GI: 402744670
PRDX6	GCACCTCCTCTTACTTCCCGGA TGCGGCCGATGGTAGTAT	S AS	GI: 59858298
GPX1	AACGTAGCATCGCTCTGAGG GATGCCCAAACCTGGTTGCAG	S AS	GI: 156602645
SOD	GTGAACAACCTCAACGTCGC GGTTCTCCACCACCGTTAG	S AS	GI: 31341527
CAT	AAGTTCTGCATCGCCACTCA GGGGCCCTACTGTCAGACTA	S AS	GI: 402693375

2.8. Statistical analysis

Statistical analyzes were performed using the GraphPad Prism software, version 8.0. The data on follicular diameters and the rate of follicular growth between the days of culture were initially subjected to analysis of normal distribution using the Kolmogorov-Smirnov test. For data normally distributed, analysis of variance was then applied. The data on follicular diameters and the rate of follicular growth between culture days were subjected the Kruskal- Wallis test. The percentes of follicular survival and formation of antrum after in vitro culture were compared by the Chi-square test. The intensity of stain in for calcein-

AM and homodimer-ethidium were compared by the Student test. The levels of mRNA were analyzed by Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's Multiple Comparison Test. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Effects of *Aloe vera* extract on follicular growth, antrum formation and viability

Table 2 shows that follicles cultured in control medium had continuous growth until day 18, while those cultured in medium supplemented with *Aloe vera* had significant growth until day 12. However, with compared to control medium, *Aloe vera* did not influence follicular growth in vitro.

Table 2. Diameters and daily growth (mean \pm standard error of the mean (SEM)) of bovine secondary follicles after 0, 6, 12 and 18 days of in vitro culture in TCM-199⁺ alone or supplemented with 2.5, 5.0, 10.0 or 20.0% *Aloe vera* extract (AV) ($P < 0.05$)

Treatment	Day0	Day6	Day12	Day18
TCM-199 ⁺	201.1 \pm 3.7 ^a	47.7 \pm 5.5 ^b	260.8 \pm 6.1 ^c	272.0 \pm 6.8 ^d
AV 2.5%	199.0 \pm 3.5 ^a	252.1 \pm 4.6 ^b	264.7 \pm 4.7 ^c	267.7 \pm 5.3 ^c
AV 5.0%	195.4 \pm 3.1 ^a	253.4 \pm 4.7 ^b	266.2 \pm 5.7 ^c	261.1 \pm 6.3 ^c
AV 10.0%	195.4 \pm 3.3 ^a	250.2 \pm 5.7 ^b	260.8 \pm 5.5 ^c	262.7 \pm 5.7 ^c
AV 20.0%	198.9 \pm 3.1 ^a	248.5 \pm 5.2 ^b	260.6 \pm 5.7 ^c	258.8 \pm 5.7 ^c

a, b, c, d Lower case letters represent statistically significant differences between treatments on the same day of cultivation (between columns).

Follicular growth rates ($\mu\text{m}/\text{day}$) at different intervals of in vitro culture are presented in Table 3. Follicles cultured for 6 days in media supplemented with 5.0% *Aloe vera* had higher growth rate than those cultured in control medium ($P < 0.05$). Between days 6 and 12, no significant differences in daily growth were seen among treatment. On the other hand, between days 12 and 18, follicles cultured with 2.5 and 10.0% *Aloe vera* extract had similar growth to follicles cultured in control medium, but those cultured with 5.0 and 20% of *Aloe vera* had reduced growth ($P < 0.05$).

Table 3. Daily growth (mean \pm standard error of the mean (SEM)) of morphologically normal bovine secondary follicles cultured in vitro TCM-199⁺ alone or supplemented with 2.5, 5.0, 10.0 or 20.0% *Aloe vera* extract (AV).

Follicular growth ($\mu\text{m}/\text{day}$) at different intervals of culture			
Treatment	Day 0-6	Dya 6-12	Dya 12-18
TCM-199 ⁺	46.6 \pm 7.8 ^{Ac}	13.1 \pm 2.2 ^{Ba}	11.2 \pm 1.9 ^{Ba}
AV 2.5%	53 \pm 8.8 ^{Aa}	12.6 \pm 2.1 ^{Ba}	3.0 \pm 0.5 ^{Ca}
AV 5.0%	58.1 \pm 9.7 ^{Ab}	12.7 \pm 2.1 ^{Ba}	-5.0 \pm -0.8 ^{Cb}
AV 10.0%	54.8 \pm 9.1 ^{Aa}	10.6 \pm 1.8 ^{Ba}	1.8 \pm 0.3 ^{Ca}
AV 20.0%	49.5 \pm 8.2 ^{Aa}	12.1 \pm 2 ^{Ba}	-1.8 \pm -0.3 ^{Cb}

a, b, c Uppercase letters represent differences between treatments (on the same day of culture). A,B,C Lowercase letters represent statistically significant differences between the culture days (same column).

Table 4 shows the percentage of normal follicles and antrum formation after 18 days of culture. The percentage of morphologically normal follicles was similar among all treatments, including the control group ($P>0.05$). Figure 1 shows that secondary follicles cultured in vitro for 18 days in all treatments had homogeneous granulosa cells, intact membrane, visible and rounded oocytes and presence of antrum cavity. Follicles cultured with 2.5% *Aloe vera* had higher percentage of antrum formation than those cultured in control medium, but did not differ from other treatments ($P<0.05$).

Table 4. Percentages of morphologically normal secondary follicles and of antrum formation after 18 days of in vitro culture in TCM-199⁺ alone or supplemented with 2.5, 5.0, 10.0 or 20.0% *Aloe vera* extract (AV).

	TCM-199⁺	AV 2.5%	AV5.0%	AV10.0%	AV20.0%
Morphologically	92.1% ^a	96.7% ^a	95.3% ^a	98.7% ^a	97.5% ^a
Normal follicles	(81/88)	(89/92)	(81/85)	(77/78)	(77/79)
Antrum formation	8.6% ^a	23.5% ^b	19.7% ^{ab}	14.3% ^{ab}	14.3% ^{ab}
	(7/81)	(21/89)	(16/81)	(11/77)	(11/77)

Significantly different ($P<0.05$).^{a,b} Uppercase letters represent differences between treatments (on the same day of culture), ($P<0.05$).

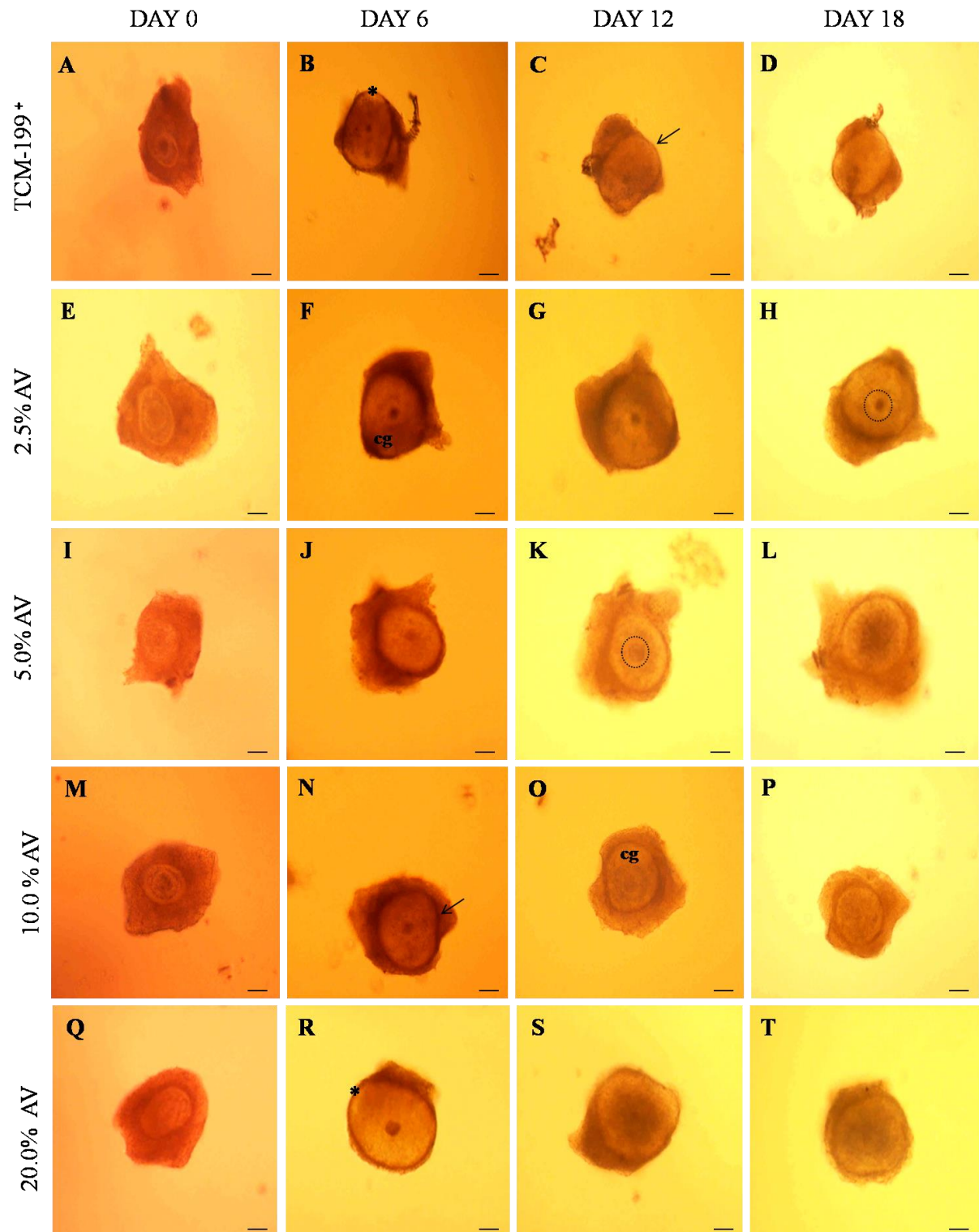


Figure 1. Follicular morphology after 18 days of culture. (A-D) Secondary follicles individually cultured in TCM-199⁺ alone; (E-H) or with 2.5 % *Aloe vera* extract (AV); (I - L) 5.0% AV; (M - P) 10.0% AV or (Q - T) 20.0% AV. Oocyte (dash circles), antrum formation (*), intact basement membrane follicle (arrows) and granulosa cells (cg). Scale bar=100μm for follicles.

3.2 Effects of *Aloe vera* extract on follicular viability

The fluorescence microscopy analysis using calcein-AM and ethidium homodimer-1 showed that, after 18 days of culture, secondary follicles cultured in medium supplemented with 2.5 or 5.0% *Aloe vera* extract had higher fluorescence intensity for calcein-AM than those cultured in control medium and other treatments ($P < 0.05$). On the other hand, follicles cultured in presence of 10.0 and 20.0% *Aloe vera* extract did not differ significantly from each other ($P > 0.05$) (Figure 2). In addition, the fluorescence intensity between calcein-AM and ethidium homodimer-1 was significantly different in all treatments, except for follicles cultured with 20% *Aloe vera* extract, where the fluorescence intensity between fluorophores did not show statistical difference ($P < 0.05$) (Figure 2).

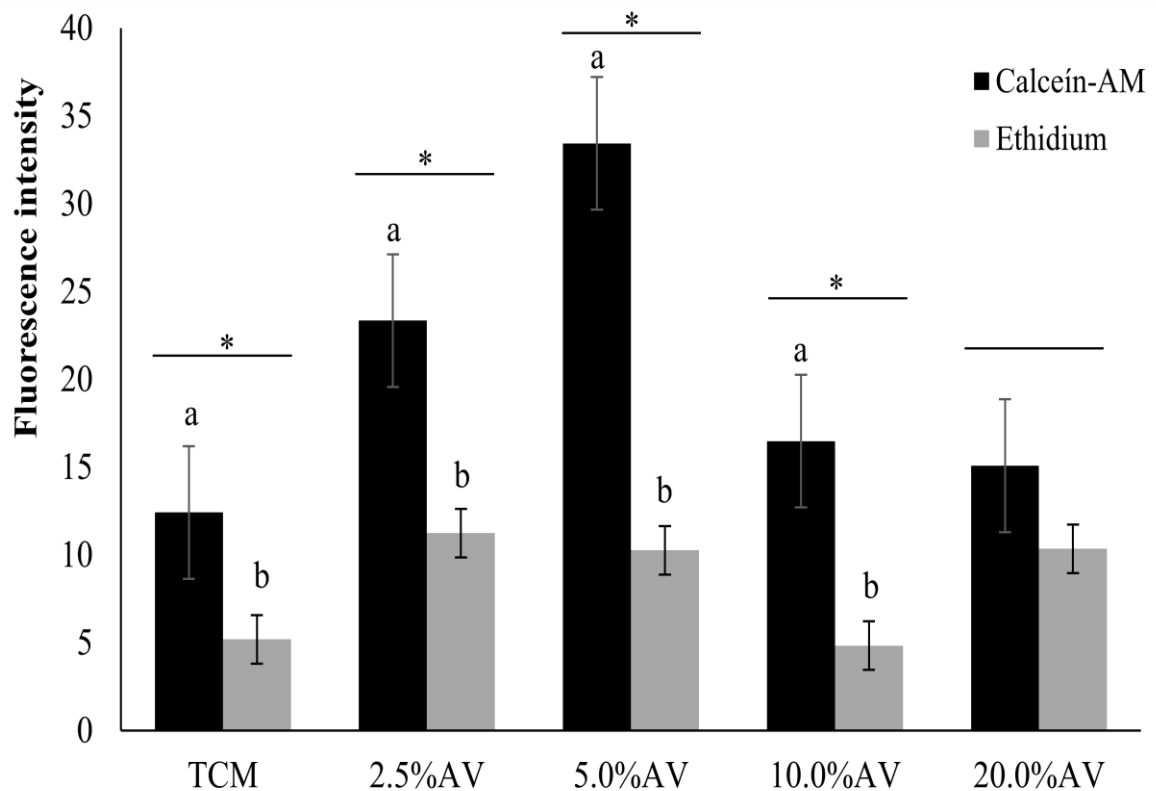


Figure 2. Fluorescence intensity of the calcein-AM (green) and ethidium homodimer (red) in bovine secondary follicle after 18 days of in vitro cultured in TCM-199⁺ alone or supplemented with different concentrations *Aloe vera* (AV) extract (2.5, 5.0, 10.0 or 20.0% AV). Significantly different ($P < 0.05$).^{A,B} Lower case letters represent statistically significant differences between treatments for the fluorescence intensity of calcein-AM; ^{a,b} Capital letters represent statistically significant differences between treatment for the fluorescence intensity of ethidium homodimer-1; *represent differences between treatments for the fluorescence intensity between calcein-AM and ethidium homodimer-1 ($P < 0.05$).

Figure 3 shows secondary follicles after 18 days of in vitro culture stained with calcein-AM and ethidium homodimer-1 in all treatments. It is possible to observe follicles cultured in presence of 2.5 and 20.0% *Aloe vera* extract had stromal cells around the follicles positively stained with ethidium homodimer-1.

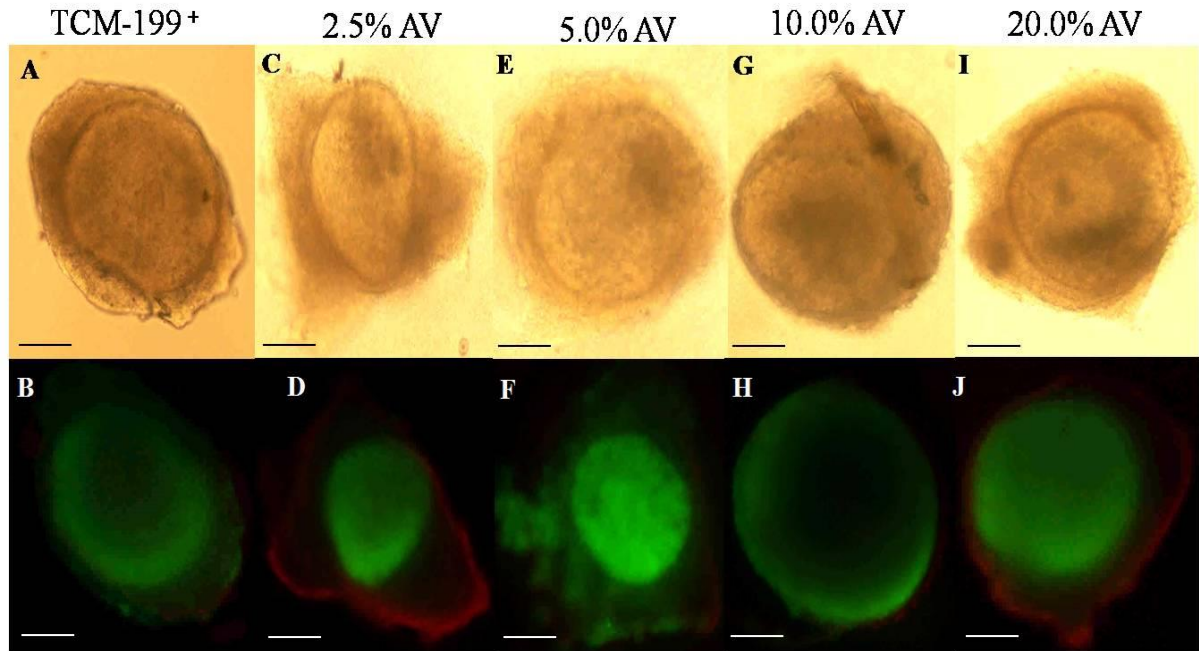


Figure 4. Viability of bovine secondary follicles after in vitro culture for 18 days after staining with calcein-AM (green) and ethidium homodimer-1 (red). Secondary follicles were cultured in TCM-199⁺ alone (A,B) or supplemented with 2.5% (C,D), 5% (E,F), 10% (G,H) or 20% (I, J) of *Aloe vera* extract (AV). The scale bars represent 100 μ m.

3.3. Expression of mRNA for *SOD*, *CAT*, *PRDX6* and *GPX1* in cultured follicles

The levels of mRNA for *SOD*, *CAT*, *PRDX6* and *GPX1* in bovine secondary follicle after 18 days of culture in TCM-199⁺ alone or supplemented with 2.5, 5.0, 10.0 and 20.0% *Aloe vera* extract are shown in Figure 4. The presence of 2.5, 5.0 and 20.0% *Aloe vera* in culture medium kept the levels of mRNA for *SOD*, *CAT* and *PRDX6* similar to control group. On the other hand, follicles cultured in presence of 10.0% *Aloe vera* extract had reduced levels of mRNA for *CAT*, when compared with control group. The expression of *GPX1* mRNA in follicles cultured with *Aloe vera* extract did not differ from control group ($P>0.05$).

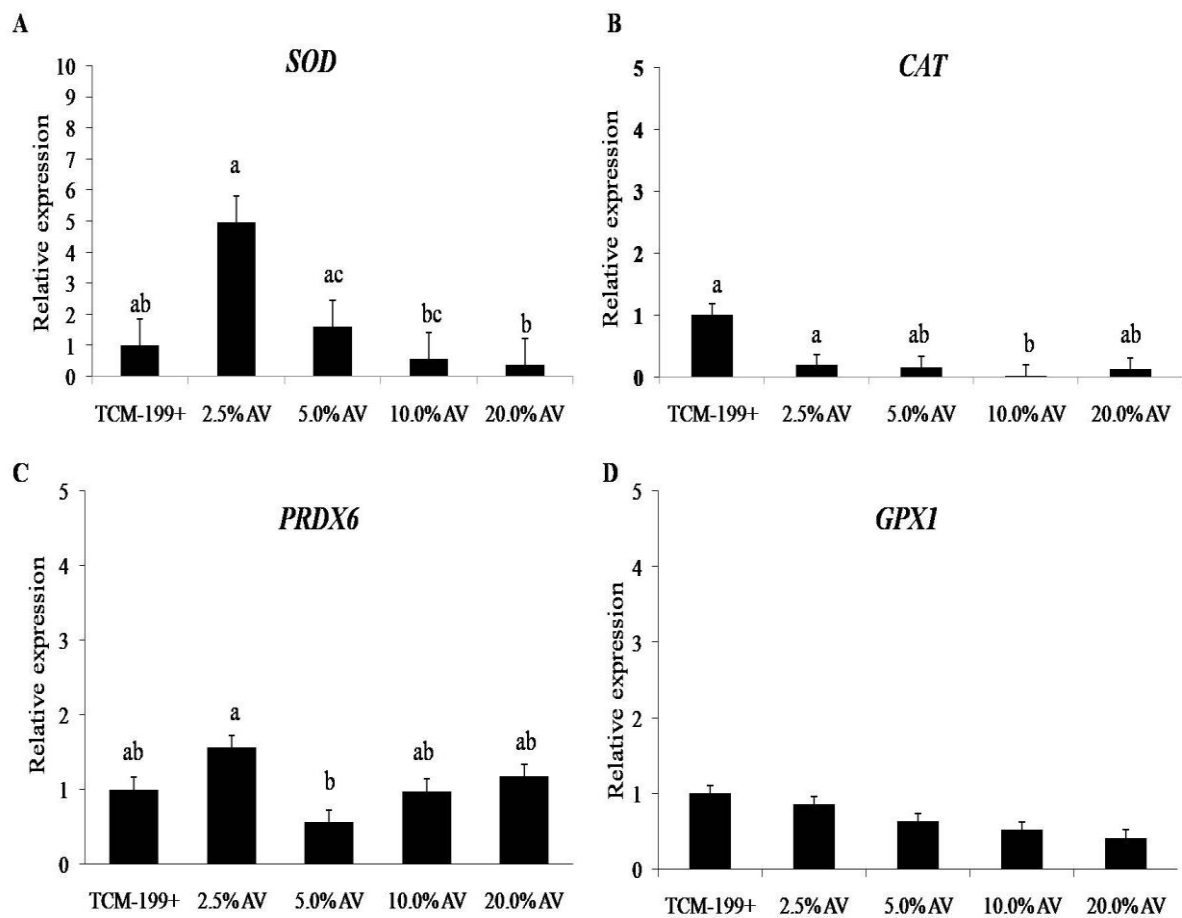


Figure 4. Levels of mRNA (means \pm standard deviation (SD)) for (A) SOD, (B) CAT, (C) PRDX6 or (D) GPX1 in secondary follicles cultured in vitro for 18 days in TCM 199⁺ alone or supplemented with 2.5, 5.0, 10.0 or 20.0% *Aloe vera* extract (AV).^{a,b,c} Lowercase letters represent statistically significant differences between treatments ($P < 0.05$).

4. Discussion

The present study is the first report to demonstrate the effects of the *Aloe vera* extract on in vitro cultured for bovine secondary follicles. *Aloe vera* extract (2.5%) increased the follicular antrum formation and viability, and maintained follicular growth and morphology. These effects can be attributed to the glycoproteins and polysaccharide present in *Aloe vera* extract that stimulate cellular growth (FIRDAUS et al., 2019). Follicles cultured in media supplemented with *Aloe vera* extract showed progressive growth until the day 12, but not between days 12 and 18. These results can be due to the intense proliferation of fibroblasts observed during this period in treatments containing *Aloe vera*. Recent investigations showed that *Aloe vera* promotes the proliferation of fibroblasts (TEPLICKI et al., 2018; FIRDAUS, et al. 2019; SHAFIIE et al., 2020). According to Surjushe, Vasani, Saple (2008), the stimulation of fibroblast proliferation is given by the presence of

glucomannan, a polysaccharide rich in mannose that is present in *Aloe vera*. In fact, when observing the daily follicular growth, all follicles cultured with *Aloe vera* showed a higher growth between days 0 and 6 in relation to the control group. Probably, the massive presence of fibroblasts around the follicles from day 12 onwards may have impaired follicular growth. Although *Aloe vera* increases the proliferation and migration of fibroblasts, it also triggers cell growth through the production of transforming growth factor beta1 (TGF- β 1), basic fibroblastic growth factor (bFGF) and also by intercellular communication through gap junctions (ATIBA et al., 2011). These growth factors act in an autocrine and/or paracrine way, regulating the development of preantral follicles (SHARMA TARU et al., 2010).

The presence 2.5% *Aloe vera* in culture medium increased the percentage of antrum formation, which is considered a marker of follicular functionality (ROSSETO et al., 2012). *Aloe vera* contains secondary metabolites that can help in the process of antrum formation, such as phytosterols (β -Sitosterol, cholesterol and campesterol) responsible for exerting effects similar to ovarian sex hormones (POORFARID; KARIMI; HOUSHMAND, 2013). A study in pregnant mice showed that *Aloe vera* has an estrogen similar effect (RENGIN AND GULLAN, 2009). This hormone performs an important role in the development of the follicle, influencing the antrum formation (DRUMMOND et al., 2012). Majumder et al. (2019) demonstrated through an in silico study that *Aloe vera* has an affinity for alpha-type estrogen receptors. Thus, it is believed that the increase in antrum formation may be related to the estrogenic effect of *Aloe vera* when added in low concentration in the culture medium of bovine secondary follicles.

The lower concentrations of *Aloe vera* (2.5 and 5.0%) increased follicular viability after culture in vitro. This effect is probably a reflection of complex interactions of different bioactive substances, such as phenolic compounds, anthraquinones and polysaccharides with cellular redox homeostasis challenged by oxidative stress (CESAR et al., 2018) associated with a possible lower rate of fibroblast proliferation. A recent study showed that *Aloe vera* significantly increased the viability of human corneal epithelial cells (HCE), with no cytotoxic effect (CEVAROLO et al., 2021). Kang et al. (2014) showed that a polysaccharide extracted from *Aloe vera* gel increases the viability of Vero cells cultured in vitro. Besides maintaining viability, *Aloe vera* showed antioxidant potential in periodontal ligament cells of human (FULZELE et al., 2016). Sun et al. (2021) also showed that aloin, an anthraquinone present in *Aloe vera* extract, attenuated oxidative stress in cardiomyocytes, decreasing the production of ROS, lactate dehydrogenase (LDH) and release of malondialdehyde (MDA).

According to Salah et al. (2019), changes in antioxidant enzyme levels can be very important in regulating the response to oxidative stress. In the present study, levels mRNA expression for SOD, CAT and PRDX6 in follicles cultured with 2.5, 5.0 and 20.0% *Aloe vera* were similar to the control group. SOD catalyzes the dismutation of superoxide radicals into H₂O₂ which is later converted to water and oxygen by CAT or GPX (SALAH et al., 2019). CAT is known to play a crucial role in antioxidant defense pathways by effectively catalyzing peroxisomes and glyoxysomes the conversion of H₂O₂ into water and oxygen. Due to its greater catalytic efficacy, CAT has been considered an important antioxidant enzyme in reproductive processes. PRDX6 expression was significantly higher in the 2.5% *Aloe vera* treatment compared to the 5.0% *Aloe vera* treatment, an important data since, according to Arevalo and Vázquez-Medina, (2018) PRDX6 is the only peroxiredoxin capable of reducing phosphor lipid hydroperoxides through of glutathione peroxidase activity, promoting protection of cells against damage caused by exposure to high levels of oxygen (WANG et al., 2006).

The reduced levels of CAT mRNAs in follicles cultured with 10.0% *Aloe vera* may be associated with the lower growth and viability. Khan et al. (2020) demonstrated that silencing of CAT gene compromised the physiological functions of bovine granulosa cells, besides to increasing intracellular levels of ROS, inducing apoptosis and impairing the homeostasis of matrix metalloproteinases, and the production of estradiol and progesterone. This lower expression of CAT is not in agreement with the results described by Cavarolo et al. (2021), who showed that *Aloe vera* positively regulated the expression of catalase, an effect that, according to the authors, could be related to aloin, a substance present in *Aloe vera* with several biological effects, including antioxidant action. We understand that this contradiction in the reports observed in this study may be associated with differences in the chemical composition of the extract. In fact, previous studies have already shown that phytochemical composition of plants is directly influenced by a variety of environmental factors, including geography, climate, soil type, exposure to the sun and seasonal changes (KUMAR et al., 2017). The ambient temperature is also a factor that plays a significant role in the evaluation of the antioxidant activity of *Aloe vera*, which is more pronounced in cold climates (IQBAL AND BHANGER, 2006).

It was also observed that the extract of *Aloe vera* did not influence the expression of mRNA for GPX1 in bovine secondary follicles cultured in vitro, which may have influenced the decrease in follicular growth observed after the 12 day of culture. GPX1 is considered a widely expressed and important member in the metabolism of ROS (CHEN et al.,

2019). GPX1 catalyze the oxidation of glutathione to hydroperoxide, playing a role in repairing damage caused by lipid peroxidation (Kurutas, 2016). Abedelahi et al. (2010) demonstrated that the reduction in the activity of antioxidant enzymes such as GPX may result in the regression of in vitro growth of pre-antral follicles.

In conclusion, *Aloe vera* maintains the morphology of secondary follicles cultured in vitro for 18 days, being that 2.5% of *Aloe vera* promotes antrum formation, increases follicular viability and maintains mRNA expression for SOD and PRDX6 after cultivation.

Acknowledgments

This research was supported by the Cearense Foundation for Support for Scientific and Technological Development (FUNCAP). V. A. N. Azevedo is recipient of scholarship from CAPES, Brazil.

Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific work.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request

References

- ABEDELAAHI, 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.977–85, 2010.
- ANDRADE, G. M. et al. Intrafollicular barriers and cellular interactions during ovarian follicle development. **Animal Reproduction**, v.16, n.3, p. 485-496, 2019.
- ANTONINO, D. C. et al. Three-dimensional levitation culture improves in-vitro growth of secondary follicles in bovine model. **Reproductive Bio Medicine Online**, v. 38, 2019.
- AREVALO, J. A. VÁZQUEZ-MEDINA, J. P. The Role of Peroxiredoxin 6 in Cell Signaling. **Antioxidants**, v.7, n.12, p.172, 2018.
- ATIBA, A. et al. *Aloe vera* oral administration accelerates acute radiation-delayed wound healing by stimulating transforming growth factor- β and Fibroblast growth factor production. **Am J Surg**, v.201, n.6, p.809-818, 2011.
- BARBERINO, R. et al. *Amburana cearensis* leaf extract maintains survival and promotes the in vitro development of secondary sheep follicles. **Zygote**, v.24, n. 2, p. 277-285, 2016.
- BARROSO, P. A. A. et al. Effects of dexamethasone on growth, viability and ultrastructure of bovine secondary follicles cultured in vitro. **Zygote**, v.28, n.6, p.504-510, 2020.
- BEHMANESH, M.A. et al. Protective effect of *Aloe vera* extract against bisphenol a induced testicular toxicity in wistar rats. **Cell Journal**, v.20, n.2, p.278-283, 2018.
- CADENAS, J. et al. Relation ship between follicular dynamics and oocyte maturation during in vitro culture as a noninvasive sign of caprine oocyte meiotic competence. **Theriogenology**, v.107, p.95-103, 2018.
- CAVALCANTE, A. Y. P. et al. The supplemented médium based on *Morus nigra* extract associated with FSH allows the survival and growth of isolated secondary ovarian follicles. **Reproduction Domestic Animal**, v.53, n.2, p. 423-432. 2018.
- CEKO, M. J. et al. Correction: X-Ray fluorescence imaging and other analyses identify selenium and GPX1 as important in female reproductive function. **Metallomics**, v.7, n.1, p.188, 2015.
- CERAVOLO, I. et al. Health Potential of *Aloe vera* against Oxidative Stress Induced Corneal Damage: An "In Vitro" Study. **Antioxidants**, v.10, n.2, p.318, 2021.
- 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, n.10, p.125, 2018.
- CHAPPEL, S. The role of mitochondria from mature oocyte to viable blastocyst. **International Obstetrics and Gynecology**, 2013.

CLARKE, H. Control of Mammalian Oocyte Development by Interactions with the Maternal Follicular Environment. **Results Probl Cell Differ**, v.63, p.17-41, 2017.

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, n.3, p.256-264, 2017.

DONFACK, N. J. et al. In vivo and in vitro strategies to support caprine preantral follicle development after ovarian tissue vitrification. **Reprod Fertil Dev**, 2018.

DRUMMOND, P. D. et al. Ovarian Actions of Estrogen Receptor- β : An Update *Ann E. Seminars in Reproductive Medicine*, v.30, n.1, 2012.

FIRDAUS, I. et al. *Aloe vera* stimulate cell proliferation, cell migration, expression of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), and c-Jun N-terminal kinase-1 (JNK-1) on fibroblast of diabetic rat models. **Journal of the Medical Sciences**, v.51, n. 2, p. 114-127, 2019.

FIGUEIREDO, J. R. et al. in vitro Folliculogenesis in domestic ruminants. **Animal Reproduction**, v.16, n. 1, p.52-65, 2019.

FULZELE, P. et al. Evaluation of *Aloe vera* Gel as a Storage Medium in Maintaining the Viability of Periodontal Ligament Cells - An in Vitro Study. **J Clin Pediatr Dent**, v.40, n.1, p.49-52, 2016.

GOMES, D. et al. Supplementation of culture medium with knockout serum replacement improves the survival of bovine secondary follicles when compared with other protein sources during in vitro culture. **Zygote**, v.28, n.1, p.32-36, 2019.

HARITHA, K.; RAMESH, B.; SARALAKUMARI, D. Effect of *Aloe vera* gel on antioxidant enzymes in streptozotocin-induced cataractogenesis in male and female Wistar rats. **Journal of Acute Medicine**, v. 4, p. 38-44, 2014.

IQBAL, S.; BHANGER, M. I. Effect of season and production location on antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaves grown in Pakistan. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.19, p.544-551, 2006.

KANGA, M. C. et al. In vitro and in vivo antioxidant activities of polysaccharide purified from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis*) gel. **Carbohydrate Polymers**, v.99, p.365-371, 2014.

KHAN, A. et al. Silencing of RNAi-Mediated of Catalase Gene Promotes Apoptosis and Impairs Proliferation of Bovine Granulosa Cells under Heat Stress. **Animals: an open access journal from MDPI**, v.10, n.6, p.1060, 2020.

KHAN, I. et al. Lupeol supplementation improves the developmental competence of 17 bovine embryos in vitro. **Theriogenology**, v. 107, p. 203-210, 2018.

KUMAR, S. et al. Impact of spatial and climatic conditions on phytochemical diversity and in vitro antioxidant activity of Indian *Aloe vera* (L.) Burm.f. **South African Journal of Botany**,

v.111, p.50-59, 2017.

KURUTAS, E. B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. **Nutr J**, v.15, p.171, 2016.

MAJUMDER, R. et al. In vitro and *in silico* study of *Aloe vera* leaf extract against human breast cancer. **Natural Product Research**, 2019.

MBEMYA, G. T. et al. Early ovine preantral follicles have a potential to grow until antral stage in two-step culture system in the presence of aqueous extract of *Justicia insularis*. **Reproduction Domestic Animal**, v.54, p.1121–1130, 2019.

MBEMYA, G. T. et al. Supplementation of in vitro culture media with FSH to grow follicles and mature oocytes can be replaced by extracts of *Justicia insularis*. **PloS one**, v. 13, n. 12, 2018.

MORAIS, et al. Natural antioxidants in the vitrification solution improve the ovine ovarian tissue preservation. **Reproductive Biology**, v.19, p.270-278, 2019.

NANDAL, U.; BHARDWAJ, R. L. *Aloe vera*: a wonderful plant for use in food, medicinal and cosmetics – a review. **International Journal Pharmaceutical Science Review Research**, v.13, p.59–67, 2012.

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

PAULINO, L. R. F. M. et al. Effects of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1beta on in vitro development of bovine secondary follicles. **Reproduction in Domestic Animals**, p.1–9, 2018.

POORFARID, M.; KARIMI, J. H.; HOUSHMAND, F. The effect of *Aloe vera* sap on progesterone, estrogen and gonadotropin in female rats. **Journal of Jahrom University of Medicinal Sciences**, v.10, n.4, 2013.

RADHA, M. H.; LAXMIPRIYA, N.P. Evaluation of the biological properties and clinical effectiveness of *Aloe vera*: A systematic review. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v.5, n.1, p.21-26, 2015.

RENGIN, K. GULLAN, A. Investigation of the effects of *Aloe barbadensis* on rat ovaries. **J. of Med. Food**, v.2, n.6, p.1393-7, 2009.

ROSSETTO, R. et al. Comparative study on the in vitro development of caprine and bovine preantral follicles. **Small Rumin Res**, v.113, p.167–170, 2012.

SÁ, 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, 2018.

SALAH, A. et al. Eugenol protects against citrinin-induced cytotoxicity and oxidative

damages in cultured human colorectal HCT116 cells. **Environ Sci Pollut Res**, v. 26, n. 3, p.1374–1383, 2019.

SEGHINSARA, M. A. et al. *Panax ginseng* Extract Improves Follicular Development after Mouse Preantral Follicle 3D Culture. **Cell J**, v.21, n.2, p.210-219, 2019.

SHAFIAIE, S. et al. Differential biological behavior of fibroblasts and endothelial cells under cultivation in *Aloe vera* gel. **International Journal of Molecular and Cellular Medicine**, v. 9, n.3, 234-246, 2020.

SHARMA, T. G. et al. Effects of IGF-1, TGF- α plus TGF- β 1 and bFGF on in vitro survival, growth and apoptosis in FSH-stimulated buffalo (*Bubalis bubalus*) preantral follicles. **Growth Hormone IGF Research**, v.20, p.319-325, 2010.

SOUZA, A.L.P. et al. Use of *Aloe vera* based extender for chilling and freezing collared peccary (*Pecaritajacu*) semen. **Theriogenology**, v. 85, n. 8, p. 1432-8, 2016.

SOVERNIGO, T. C. et al. Effects of supplementation of medium with different antioxidants during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. **Reproduction Domestic Animals**, v. 52, n. 4, p. 561-569, 2017.

SUMI, F. A. et al. Analysis of the phenolic content of aloevera gel and evaluation of the effect of aloe gel supplementation on oxidative stress and fibrosis on cardiac damage administered by isoprenaline in rats. **Prev Nutr. Sci**, v.24, n.3, p.254–264, 2019.

SUN, W. et al. Aoin antagonizes stimulated ischemia/reperfusion-induced damage and inflammatory response in cardiomyocytes by activating the Nrf2/HO-1 defense pathway. **Cell Tissue Res**, 2021.

SURJUSHE, A. VASANI, R. SAPLE, D. G. *Aloe vera*: A short review. **Indian Journal of Dermatology**, v.53, p. 163-166, 2008.

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

VAN DEN HURK, R. et al. Ultrastructure and viability of isolated bovine preantral follicles. **Hum Reprod Update**, v.4, p.833–41, 1998.

VASCONCELOS, E. M. et al. Eugenol influences the expression of messenger RNAs for superoxide dismutase and glutathione peroxidase 1 in bovine secondary follicles cultured *in vitro*. **Zygote**, v.18, p.1-6, 2021.

WANG, Y. et al. Transgenic mice overexpressing peroxiredoxin 6 show increased resistance to lung injury in hyperoxia. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v.34, p.481–6, 2006.

YAGI, A. et al. Antioxidant, free radical scavenging and anti-inflammatory effects of aloesin derivatives in *Aloe vera*. **Plant Med**, v.68, n.11, p.957-60, 2002.

8. CONCLUSÕES GERAIS

O estudo avaliou a ação do extrato da *Aloe vera* no meio de cultivo. A partir das análises realizadas verificou-se que a *Aloe vera* permite o crescimento de folículos até 12 dias de cultivo em todas as concentrações testadas. A presença de 2,5% do extrato de *Aloe vera* no meio de cultivo promove a formação do antro e aumenta a viabilidade folicular após 18 dias de cultivo. Além disso, 2,5% *Aloe vera* mantém a morfologia e a expressão de mRNA para SOD e PRDX6 após o cultivo.

9. PERSPECTIVAS

Extratos vegetais como o da *Aloe vera* apresentam um vasto potencial farmacológico ainda a ser explorado, principalmente no que diz respeito à dinâmica folicular ovariana. Embora os mecanismos de ação não sejam claros, os resultados obtidos neste trabalho poderão auxiliar na compreensão dos efeitos da *Aloe vera* no desenvolvimento folicular pré-antral, com informações sobre a expressão de transcritos de enzimas antioxidantes e do seu efeito no desenvolvimento de folículos secundários bovinos. Tendo em vista a variação na composição fitoquímica do extrato de *Aloe vera* acredita-se que o seu uso na forma liofilizada ao meio de cultivo possa ser uma estratégia para mitigar essas variações e melhor interpretar os seus efeitos no cultivo de folículos ovarianos. Além disso, ressalta-se a necessidade de novas investigações para uma compreensão mais detalhada dos achados aqui relatados.

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI, F S. et al. Effect of *Phoenix dactylifera* pollen grain on maturation of preantral follicles in NMRI mice. **Journal of Herb Med Pharmacology**, v. 4, p. 93-97,2015.
- ABDUL, Q. M. et al. Evaluation of Phenolic Compounds and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Some Common Herbs. **Int J Anal Chem**, v.2017, 2017.
- ABEDELAAHI, A.; SALEHNIA, M.; ALLAMEH, A. A.; DAVOODI, D. 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, **Human Reproduction**, v.25, p.977–985, 2010.
- ADONA, P. R. Oogenesis and folliculogenesis in mammals. **UNOPAR, Ciências BiolSaúde**, v. 15, n.3, p.245-250, 2013.
- AGARWAL, A.; DURAIRAJANAYAGAM, D.; DU PLESSIS, S. S. Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. **Reprod Biol Endocrinol**, v.12, p.112, 2014.
- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SIKKA, S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. **Curr Opin Obstet Gynecol**, v. 18, n.3, p. 325-32, 2006.
- AGUIAR, F.L.N. et al. FSH supplementation to culture medium is beneficial for activation and survival of preantral follicles enclosed in equine ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 85, p.1106-1112, 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 NorteNordeste de Reprodução Animal Ciência Animal, 6, Fortaleza, CE. Fortaleza, CE: **CONERA**, p. 283-286,2012.
- ALI, P.; CHEN, Y. F.; SARGSYAN, E. Bioactive molecules of herbal extracts with anti-infective and wound healing properties. In: Kon K., Rai M., editores. **Microbiology for surgical infections**, p. 205–220, 2014.
- ALI, S. S. et al. Understanding oxidants and antioxidants: classic team with new players. **Journal of Food Biochemistry**, p.131-145, 2020.
- ALMEIDA, J. M. Embriologia veterinária comparada. Rio de Janeiro, Brasil: **Gunabara Koogan**, 1999.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Quim Nova**, v.33, n.10, p.2202-10, 2010.
- ALVES, K. A. et al. Mechanical isolation of preantral follicles from bitches - Effect of section interval. **Archives of Veterinary Science**, v. 17, p. 15-21, 2012.
- ANDRADE, E.R. et al. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.34, n.2, p.79-85, 2010.

ANDRADE, G. M. et al. Intrafollicular barriers and cellular interactions during ovarian follicle development. **Animal Reproduction**, v.16, n.3, p. 485-496, 2019.

ANILAKUMAR, K. R. et al. Effect of *Aloe vera* gel extract on antioxidant enzymes and azoxymethane-induced oxidative stress in rats. **Indian J Exp Biol**, v.48, n.8, p.837-842,2010.

ARAÚJO, R.A. et al. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12, 2014a.

ARAÚJO, V. R. et al. In vitro development of bovine secondary follicles in two- and three-dimensional culture systems using vascular endothelial growth factor, insulin-like growth factor-1, and growth hormone. **Theriogenology**, v. 82 , p.1246–1253, 2014b.

ARAÚJO, V. R. et al. Role of Bone Morphogenetic Proteins-6 and -7 (BMP-6 and -7) in theregulation of initial folliculogenesis in mammals. **Rev Bras Reprod Anim**, v.34, p.69-78, 2010.

AUGUSTIN, R. et al. Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos produced *in vitro*. **Reproduction**, v. 126, n. 1, p. 91-99, 2003.

ÁVILA, A. C. F. C. M. **Efeitos da comunicação entre células do sistema reprodutivo feminino e oócitos bovinos mediada por vesículas extracelulares de diferentes estágios do ciclo estral**. 2019. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/74/74135/tde-25102019113400/publico/ME10227328COR.pdf>>. Acesso em: 2020-03-04.

BALL, B. A. et al. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 C. **Theriogenology**, New York, v.56, n.4,p.577-589, 2001.

BARBOSA, K. B. et al. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Nutrition Magazine**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARREIROS, A. L. 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.113-23, 2006.

BEHMANESH M.A.; NAJAFZADEHVARZI H.; POORMOOSAVI S.M. Protective effect of *Aloe vera* extract against bisphenol A induced testicular toxicity in wistar rats. **Cell Journal**, v. 20, n. 2, p. 278-283, 2018.

BENITES, N. R; BARUSELLI, P. S.. Medicamentos empregados para sincronização do crescimento folicular e da ovulação para transferência de embriões. In H. S. SPINOSA, S. L.GÓRNIK; M. M. BERNARDI (Eds.), *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. Rio de Janeiro, Brasil: **Guanabara Koogan**,p. 329-344, 2011.

BENZIE, I. F.; WACHTEL-GALOR, S. Herbal medicine: Biomolecular and clinical aspects. New York, **CRC Press**, 2011.

BEZERRA, M. E. S. et al. Resveratrol promotes in vitro activation of ovine primordial follicles by reducing DNA damage and enhancing granulosa cell proliferation via

phosphatidylinositol 3-kinase pathway. **Reproduction in Domestic Animals**, v.53, n.6, p.1298-1305, 2018.

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

BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T. K. . Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). **Theriogenology**, v.66, p.5-13, 2006.

BRITO, I. R. et al. Threedimensional systems for in vitro follicular culture: overview of alginate-based matrices. **Reprod Fertil Dev**, v.26, p.915–30, 2014.

BRUNNER, D. et al. Serum-free cell culture: The serum-free media interactive online database. **Altex**, v. 27, n.1/10, 2010.

BUSCHER, D.; DELGADO, M.; GONZALEZ-REY, E. Uses of mesenchymal stemcells.U.S. **Patent Application**, v.13, p.467, 2009.

CADENAS, J et al. Relationship between follicular dynamics and oocyte maturation during invitro culture as a noninvasive sign of caprine oocyte meiotic competence. **Theriogenology**, v.107, p.95-103, 2018.

CARVALHO, A. A. et al. Catalase addition to vitrification solutions maintains goat ovarian preantral follicles stability. **Research in Veterinary Science**, v. 97, n. 1, p. 140–147, 2014.

CAVALCANTE, B. N. et al. Effects of melatonin on the morphology and development of primordial follicles during in vitro culture of bovine ovarian tissue . **Reproduction in Domestic Animals**, v.54, p.1567-1573, 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.

CHAUBE, S. K. et al. Neem (*Azadirachta indica* L.) leaf extract deteriorates oocyte quality by inducing ROS-mediated apoptosis in mammals. **Springer Plus**, v. 3, p. 464, 2014.

CHEESEMAN, K. H.; SLATER, T. F. An introduction to free radical biochemistry. **British Medical Bulletin**, v. 49, n.3, p. 481-493, 1993.

CLARKE, H. J. Regulation of germ cell development by intercellular signaling in the mammalian ovarian follicle. **Wiley Interdiscip Rev Dev Biol**, v. 7, n.1, p.10, 2018.

COMBELLES, C.M. et al. Profile of superoxide dismutase isoenzymes in developing bovine antral follicle compartments. **Reproduction**, v.139, n.5, p.871-881, 2010.

COMBELLES, C.M.; GUPTA, S.; AGARWAL, A. Could oxidative stress influence the in-vitro maturation of oocytes? **Reproductive BioMedicine Online**, v. 18, n. 6, p. 864- 880, 2009.

CÓRDOVA, B. et al. Effect of the addition of insulin–transferrin–selenium and/or L-ascorbic acid to the in vitro maturation of prepubertal bovine oocytes on cytoplasmic maturation and embryo development. **Theriogenology**, v. 74, p.1341–1348, 2010.

- COSTA, F. C. **Efeito da *Aloe vera* no cultivo *in vitro* e na criopreservação de folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano de bovinos.** Dissertação (mestrado em biotecnologia) – Universidade Federal do Ceará, Sobral, 2020. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/51366/3/2020_dis_ffcosta.pdf>. Acesso em: 10jun.2020.
- 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, n.3, p.256-264, 2017.
- DARZI, S. et al. Immunobiology and application of *Aloe Vera* based scaffolding in tissue engineering. **Jornal internacional de ciências moleculares**, v, 22, n.4, p.1708,2021.
- DE CESARO, M. P. **Regulação do sistema peptídeos natriuréticos nas células da granulosa e do cúmulo na foliculogênese em bovinos.** 2011. 205 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Área de Concentração em Sanidade em Reprodução animal. Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2011. Disponível em: <<http://w3.ufsm.br/ppgmv/images/teses2017/Matheus%20PDC.pdf>>. Acesso em: 26 mar.2018.
- DEMEESTERE, I. et al. Impact of various endocrine and paracrine factors on culture of preantral follicles in rodents. **Reproduction**, v. 130, p. 147-156, 2005.
- DOMINGUES, S. F. S. Mechanical isolation of capuchin monkey (*Cebus apella*) preantral ovarian follicles. **Brazilian Archive of Veterinary Medicine and Animal Science**, v. 55, p.301-308, 2003.
- DONG, F. L. et al. An research on the isolation methods of frozen-thawed human ovarian preantral follicles. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 7, p.2298–2303, 2014.
- EL-SHAHAT, K. H.; KANDIL, M. Antioxidant capacity of follicular fluid in relation to follicular size and stage of estrous cycle in buffaloes. **Theriogenology**, v.77, n.8, p.1513-1518, 2012.
- ENDERS, A. C.; NELSON, D. M. Pinocytotic activity of the uterus of the rat. **American Journal Anatomy**, v.138, n.3, p. 277-299, 1973.
- EPPIG, J. J.; O'BRIEN, M. J. Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. **Biol. Reprod**, v.54, p. 197-207, 1996.
- ESCOBAR, M. L.; ECHEVERRÍA, O.M.; VÁZQUEZ-NIN, G.H. Immunohistochemical and ultrastructural visualization of different routes of oocyte elimination in adult rats. **Eur J Histochem**, v.56, p.102–110, 2012.
- ESTAKHR, J.; JAVDAN, N. Spermatogenic activity of *Aloe vera* in adult male rats. **Phar-macology online**, v. 2, p. 886-889, 2011.
- FABBRI, R. et al. Confocal laser scanning microscopy analysis of bioenergetic potential and oxidative stress in fresh and frozen-thawed human ovarian tissue from oncologic patients. **Fertility and Sterility**, v.10, n.3, p.795–804., 2014.

- FAIR, T. et al. Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles. **Mol Reprod Dev**, v.46, p.208-215, 1997.
- FELGUEIRAS, J. et al. State-of-the-art in reproductive bench science: Hurdles and new technological solutions. **Theriogenology**, v.150, p.34-40, 2020
- FIGUEIREDO, J. R. et al. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção in vitro de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.143-152, 2007.
- FIGUEIREDO, J. R. L. et al. Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. **Theriogenology**, v. 40, p. 789799, 1993.
- FIGUEIREDO, J. R.; CADENAS, J.; LIMA, L. F.; SANTOS, R. R. Advances in in vitro folliculogenesis in domestic ruminants. **Animal Reproduction**, v.16, n. 1, p.52-65, 2019.
- FIGUEIREDO, J. R.; LIMA, L. F. Tecnologia do ovário artificial: aplicações, estado da arte, limitações e perspectivas. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.41, n.1, p.248-253, 2017.
- FIGUEIREDO, J. R.; LIMA, L. F.; SILVA, J. R.; SANTOS, R. R. Control of growth and development of preantral follicle: insights from in vitro culture. **Animal Reproduction**, v.15, p.648-659, 2018.
- 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 à Reprodução Animal. **Ed. Varela**, São Paulo, p. 228 – 254. 2002.
- FISHER, A. B. et al. A new activity of lysophosphatidylcholine acyl transferase is expressed by peroxylxine 6. **J. Lipid Res**, v.57, p.587–596, 2016.
- FLOHÉ, L.; TOPPO, S.; COZZA, G. A comparison of thiol peroxidase mechanisms. **Antioxidant Redox Signal**, v. 15, n. 3, p. 763-780, 2011.
- FRESHNEY, R. I. **Culture of specific cell types**, John Wiley e Sons, Inc., 2005. GAMBOA-GÓMEZ, C. I. et al. Plants with potential use on obesity and its complications. **EXCLI J**, v.4, p.809–831, 2015.
- GATHWALA, G.; AGGARWAL, R. Selenium supplementation for the preterm Indian neonate. **Indian Journal of Public Health**, v.60, n.2, p.142– 144, 2016.
- GIANNAKOUDAKIS, D. A. et al. *Aloe vera* waste biomass-based adsorbents for the removal of aquatic pollutants: A review. **Journal of environmental management**, v.227, p.354-364, 2018.
- GIGLI, I. Et al. Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. **InVet**, v. 8, n.1, p.183-203, 2006.

GOMES, D. et al. Supplementation of culture medium with knockout serum replacement improves the survival of bovine secondary follicles when compared with other protein sources during in vitro culture. **Zygote**, v.28, n.1, p.32-36, 2019.

GOMES, H. A. N. **Efeito da proteína morfogenética óssea 15 (bmp15) no cultivo insitu de tecido ovariano de catetos (Pecari tajacu LINNAEUS, 1958)**. 2019.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Áreas de concentração em Sanidade e Reprodução Animal. Universidade Federal Rural do Semiárido, Rio Grande do Norte dissertação, 2019.

Disponível em: <<http://repositorio.ufersa.edu.br/browse?type=author&value=Gomes%2C++Henrique+Albano+Nogueira>>. Acesso em: 26 de mar de 2020.

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.

GREEN, L. J.; SHIKANOV, A. In vitro culture methods of preantral follicles. **Theriogenology**. v. 1; n. 86, p. 229-38, 2016.

GUPTA, M. K.; UHM, S. J.; LEE, H. T. Effect of vitrification and beta-mercaptoethanol on reactive oxygen species activity and in vitro development of oocytes vitrified before or after in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, v.93, p.2602-2607, 2010.

GUPTA, S. et al. Estresse oxidativo e seu papel na infertilidade feminina e na reprodução assistida: implicações clínicas. **Int J Fertil Steril**, v.2, p.147-164, 2009.

GUPTA, S.; KIM, Y.; AGARWAL, A. The Role of oxidative stress and antioxidants in assisted reproduction. **Current Women's Health Reviews**, v.6, p. 227-238, 2010.

GUTIERREZ, C.G. et al. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. **Biol Reprod**, v.62, p.1322-1328, 2000.

HAAG, K. T. et al. Equine preantral follicles obtained via the Biopsy Pick-Up method: histological evaluation and validation of a mechanical isolation technique. **Theriogenology**, v. 79, n. 5, p. 735-743, 2013.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. Reprodução Animal. **Editora Manole**, Brasil, v. 1, p.513, 2004.

HAHN, G. F. et al. O papel do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) no diabetes mellitus. **Clinical & Biomedical Research**, v. 37, n. 3, p.203-213, 2017.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox Biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v.141, n.2, p.312-322, 2006.

HARITHA, K.; RAMESH, B.; SARALAKUMARI, D. Effect of Aloe vera gel on antioxidant enzymes in streptozotocin-induced cataractogenesis in male and female Wistar rats. **Journal of Acute Medicine**, v. 4, p. 38-44, 2014.

HEŚ, M. et al. Aloe vera (L.) Webb.: Natural Sources of Antioxidants - A Review. **Plant Foods Hum Nutr**, v.74, n.3, p.255-265, 2019.

HICKEY T.E. et al. Androgens augment the mitogenic effects of oocyte-secreted factors and growth differentiation factor-9 on porcine granulosa cells. **Biol Reprod**. 73:825-832.2005.

HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovary. **International Review of Cytology**, v. 124, p. 43-101, 1991.

- HONDA, A.; HIROSE, M.; HARA, K et al. Isolation, characterization and in vitro and in vivo differentiation of putative thecal stem cells. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v.104, p.12389- 12394, 2007.
- HOZYEN, F. H. et al. Seasonal changes in some oxidizing and antioxidant parameters during folliculogenesis in Egyptian buffaloes. **Animal Reproduction. Sci**, v.151, n.3-4,p.131-136, 2014.
- HUANG, C. F. et al. Increased expression of peroxiredoxin 6 and cyclophilin A in squamouscell carcinoma of the tongue. **Oral Dis**, v.17, p.328-334, 2011.
- HUGH, J. C. Regulation of germ cell development by intercellular signaling in the mammalian ovarian follicle. **Wires Developmental Biology**, v.7, 2018.
- HUNG, W. et al. Stage-specific follicular extracellular vesicle uptake and regulation of bovine granulosa cell proliferation. **Biology of Reproduction**,Champaign, v. 97, p. 644–655, 2017.
- IDELCHIK, M. P. S. et al. Mitochondrial ROS control of cancer. **Seminars in Cancer Biology**, p.0–1, 2016.
- ITOH, T. et al. Growth, antrum formation, and estradiol production of bovine preantral follicles cultured in a serum-free medium. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1099- 1105, 2002.
- JAVED, S.; ATTA-UR, R. *Aloe vera* gel in the food, health care and cosmetics industry. **Studies in Natural Products Chemistry**. Amsterdã, Holanda, p. 261–285,2014.
- JIANG, D.; JAMES, F.R. Oxidation Chemistry of DNA and p53 Tumor Suppressor Gene. **Chemistry Open**, v. 8, n.3, p. 252-265, 2019.
- JIN S.Y. et al. A novel two-step strategy for in vitro culture of early-stage ovarianfollicles inthe mouse. **Fertility and Sterility**, v. 93, n.8, p.2633-2639, 2009.
- JOHNSON, F.; GIULIVI, C. Superoxide dismutases and their impact on human health. **Mol Aspects Med**, v.26, n.4-5, p.340-352, 2005.
- JONES, A. S. K.; SHIKANOV, A. Follicle development as an orchestrated signalingnetworkin a 3D organoid. **J Biol Eng**, v.13, n.2, 2019.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. 12 . ed. - Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 558 p, 2013.
- KAMALAMMA, P. et al. Effect of leptin on in vitro development of ovine preantral ovarianfollicles. **Theriogenology**, v. 85, p. 224-9, 2016.
- KANG, S. W.; BAINES, I. C.; RHEE, S. G. Characterization of a mammalian peroxyroxinecontaining a conserved cysteine. **J. Biol. Chem**, v.273, p.6303-6311, 1998.
- KERE, M. et al. Ascorbic Acid Improves the Developmental Competence of Porcine OocytesAfter Parthenogenetic Activation and Somatic Cell Nuclear Transplantation. **Journal of Reproduction and Development**, v. 59, p.78-84, 2013.

- KHAN, I. et al. Lupeol supplementation improves the developmental competence of 17bovine embryos in vitro. **Theriogenology**, v. 107, p. 203–210, 2018.
- KONIG, H. E; LIEBICH, H. G. Anatomia dos Animais Domésticos: **Artmed Editora**,2011.
- KUMAR, R. et al. Therapeutic potential of *Aloe vera*-A miracle present in nature. **Phytomedicine**, v. 60, 2019.
- KUMAR, S. et al. Effect of climate change on phytochemical diversity, total phenolic content and in vitro antioxidant activity of *Aloe vera* (L.) Burm.f. **BMC Research Notes**, v.10, n.60, p.1-12, 2017.
- KURUVILA, A. et al. Cloning and sequencing of FSH receptor gene from buffalo preantral follicles. **European journal of biological sciences**, v. 2, n. 4, p. 91-95, 2010.
- 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, n.1, p. 458-470, 2013.
- LEE, M.S et al. The beneficial effects of insulin and metformin on in vitro developmental potential of porcine oocytes and embryos. **Biol. Reprod**, v.73, p.1264–8, 2005.
- LEITÃO, C. C. F. et al. Importance of local growth factors in the regulation of ovarian folliculogenesis in mammals. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 3, p. 215-224, 2009.
- LEYENS, G. et al. Peroxiredoxin 6 Is Upregulated in Bovine Oocytes and Cumulus Cells During In Vitro Maturation: Role of Intercellular Communication. **Biology of Reproduction**, v.71, p.1646–1651, 2004.
- 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, n. 3, p. 467-475, 2016.
- LIM, J.; HANSEL, W. Exogenous substances affecting development of *in vitro*-derived bovine embryos before and after embryonic genome activation. **Theriogenology**, v. 53, n. 5, p. 1081-1091, 2000.
- LIMA-VERDE, I. B; ROSSETTO, R; FIGUEIREDO, J. R. Influência dos hormônios esteroides na foliculogênese. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 4, p.472-482, 2011.
- LIN, Y. H et al. Comparison of Quinn's Advantage fertilization medium and tissue culture medium 199 for in vitro maturation of oocytes. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.53, p. 17-20, 2014.
- 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. 263–70, 2017.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Análise de dados relativos à expressão gênica usando PCR quantitativo em tempo real e o método $2^{-\Delta\Delta C(T)}$. **Méthods**, v.25, n. 4, p.402-8, 2001.

- LU, J. et al. A novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction. **Reprod Biol Endocrinol**, v.16, n.1, p.80, 2018.
- LUCCIC.M. et al. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. **Small Rum. Res.** 41:61-69, 2001.
- LUSHCHAK V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chem Biol Interact**, v.224, p.164-175, 2014.
- MAGALHÃES, D. M et al. Hormônio do crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I): importantes reguladores das foliculogêneses in vivo e invitro. **Rev Bras Reprod Anim**, v.36, p.32-38, 2012.
- MAIA, M. S. **Viabilidade espermática e geração de metabólitos Reativos do Oxigênio (ROS) no semen ovino criopreservado em diluidor aditivado de Lauril Sulfato de Sódio(OEP), Trolox-C e Catalase.** 2006. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/105979/maia_ms_dr_botfmvz.pdf?seq=1&isAllowed=y>. Acesso em: 26 de mar de 2020.
- MAJUNDER, R. et al. In vitro and in silico study of *Aloe vera* leaf extract against human breast cancer. **Natural Product Research**, 2019.
- MANEVICH, Y.; FEINSTEIN, S. I.; FISHER, A. B. Activation of the antioxidant enzyme peroxiredoxin 1-CYS requires heterodimerization-mediated glutathylation with pi GST. **Proc.Natl. Acad. Scim**, v.101, p.3780-3785, 2004.
- MAO, J. et al. Effects of culture medium, serum type, and various concentrations of follicle-stimulating hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1197-1203, 2002.
- MARGIS, R. et al. Glutathione peroxidase family—An evolutionary overview. **FEBS Journal**, v.275, n.15, p.3959–3970, 2008.
- MARTELLI, F.; NUNES, F. M. F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Ciência e Cultura**, v.66, n.3, p. 54-57, 2014.
- MARTINEZ-MADRID, B. et al. Freeze-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with a passive cooling device. **Fertility and Sterility**, v. 82, p. 1390-1394, 2004.
- MARTÍN-ROMERO, F. J. et al. Contribuição dos meios de cultura para o estresse oxidativo e seus efeitos sobre oócitos humanos. **Reprod Biomed Online**, v.17, n.5, p.652-61, 2008.
- MATHIVANAN, S.; JI, H.; SIMPSON, R. J. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 10, p. 1907–1920, 2010.
- MCLAUGHLIN, M. et al. Activin promotes follicular integrity and oogenesis in cultured preantral bovine follicles. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, p. 644-653, 2010.
- MEHTA T.S.; KIESSLING, A. A. Development potential of mouse embryos conceived in vitro and cultured in ethylenediaminetetraacetic acid with or without amino acids or

serum. **Biology of Reproduction**, v.43, n.4, p.600-606, 1990.

MERLO, E. et al. The environmental pollutant tributyltin chloride disrupts the hypothalamic-pituitary-adrenal axis at different levels in female rats. **Endocrinology**, v.157, p.2978–2995, 2016.

MIMURA, J.; ITOH, K. Role of Nrf2 in the pathogenesis of atherosclerosis. **Free Radic Biol Med**, v. 88, p. 221-32, 2015.

MOGHADDASI, M. S. *Aloe vera* chemicals and usages. **Abstracts Advances in Environmental Biology**, v. 4, n. 3, p. 464-468, 2010.

MORAES, A. M.; MENDONÇA, R. Z.; SUAZO, C. A. T. “Meios de Cultura para Células Animais”. In: Moraes, A.M.; Augusto, E.F.P.; Castilho, L.R. (eds), 69 Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica, cap. 5, São Paulo, **Editora Roca**, 2008.

MORAES, J. C. F. Controle do estro e da ovulação em ruminantes. In P. B. D. GONÇALVES, J. R. FIGUEIREDO; V. J. F. FREITAS (Eds.), *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*, São Paulo, Brasil: **Roca**, p. 33-56, 2014.

MORAIS, M. L. G. S. et al. Natural antioxidants in the vitrification solution improve the ovine ovarian tissue preservation. **Reproduc Biol**, v.19, n.3, p.270-278, 2019.

MORITA, Y.; TILLY J. L. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Dev Biol*. 1999; 213:1–17. Byskov AG. Cell kinetic studies of follicular atresia in the mouse ovary. **J Reprod Fertil**, v.37, p.277–85, 1974.

MOSTEK, A. et al. Cryopreservation of bull semen is associated with carbonylation of sperm proteins. **Theriogenology**, v. 92, p. 95–102, 2017.

NAHAR, T. et al. *Aloe vera* gel protects the liver from damage induced by oxidative stress in the experimental model of rats. **J Complement Integr Med**, v.10, n.1, p.1–7, 2013.

NASCIMENTO, T.S. et al., Effect of red propolis extract isolated or encapsulated in nanoparticles on the in vitro culture of sheep pre-antral follicles: impacts on antrum formation, mitochondrial activity and glutathione levels. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n.1, p. 31-38, 2018.

NAVAKANITWORAKUL, R et al. Characterization and small RNA content of extracellular vesicles in follicular fluid of developing bovine antral follicles. **Scientific Reports**, v.6, n.1, 2016.

NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **Royal Society of Chemistry**, 2015.

NITURE, S. K.; KHATRI, R.; JAISWAL, A. K. Regulation of Nrf2-an update. **Free Radic Biol Med**, v.66, p. 36- 44, 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. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 5, p. 1682-1686, 2003.

- OKTAY, K. et al. Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, v. 67, p. 481-486, 1997.
- OKTEM, O.; OKTAY, K. The ovary: anatomy and function throughout human life. **Ann NY Acad Sci**, v.1127, p.1-9, 2008.
- OLIVEIRA, S. C.; SARAPIÃO, V. R.; QUINTÃO, C. C. R. **Biotécnicas em Reprodução animal**. Juiz de Fora, MG: Embrapa gado de leite, 2014.
- OTSUKI, J. et al. The influence of the redox state of follicular fluid albumin on the viability of aspirated human oocytes. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 58, n. 3, p. 149-153, 2012.
- 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, n. 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, n. 4, p. 994-1003, 2016.
- PALHARIN, L.H.D. et al. Efeitos fitoterápicos e homeopáticos da babosa. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v. 7, n.14, 2008.
- PARK, Y. S. et al. Eccentric localization of catalase to protect chromosomes from oxidative damage during meiotic maturation in mouse oocytes. **Histochem Cell Biol**, v.146, n.3, p.281-288, 2016.
- PASSOS, M. J. et al. The accelerated growth of bovine preantral follicles in vitro after stimulation with FSH and BMP-15 is accompanied by ultrastructural changes and increased atresia. **Theriogenology**, v.79, p.1269-1277, 2013.
- PAULINO, L. R. F. M et al. Effects of epidermal growth factor and progesterone on the development, ultrastructure and gene expression of secondary bovine follicles grown in vitro. **Theriogenology**, v.142, p.284-290, 2020.
- 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. **Reproduction in Domestic Animals**, p.1-9, 2018.
- PEPE G.J. et al. Regulation of baboon fetal ovarian folliculogenesis by estrogen. **Mol. Cell. Endo**, v.247, p.41-46, 2006.
- PHELAN, K. AND MAY, K.M. Basic Techniques in Mammalian. **Cell Tissue Culture Current Protocols in Cell Biology**, n. 66, 2015.
- PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55-74, 2015.
- PLAZAS, D.C.S. **Efeito dos extratos de *Spirulina Maxima* Kefirno cultivo de folículos pré-antrais de suíno**. Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2015. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/41455/R%20>

%20D%20%20DIANA%20CAROLINA%20SAAVEDRA%20PLAZAS.pdf?sequence=2&isAllowed=y> Acesso em: 11 jun. 2020.

RADHA, M. H.; LAXMIPRIYA, N. P. Evaluation of biological properties and clinical effectiveness of *Aloe vera*: A systematic review. **J. Tradit. Complement. Med**, v.5, p.21–26, 2015.

RAHMAN, S.; CARTER, P.; BHATTARAI, N. *Aloe Vera* for tissue engineering applications. **J Funct Biomater**, v. 8, n.1, 2017.

RAMOS, A.P.; PIMENTEL, L.C. *Aloe vera* action on tissue repair and healing. **Brazilian Journal of Health**, v.2, n.1, p.40-48, 2011.

RATHEE, J. S.; HASSARAJANI, S. A.; CHATTOPADHYAY, S. Antioxidant activity of *Mammealongifolia* bud extracts. **Food Chemistry**, v.99, n.3, p.436-43, 2006.

RIBEIRO, R.P. et al. Effects of jacalin and follicle stimulating hormone on in vitro goat primordial follicle activation, survival and gene expression. **Zygote**, v. 537, n. 4, p. 49, 2015.

RIMON-DAHARI, N. et al. Ovarian Folliculogenesis. In: Molecular Mechanisms of Cell Differentiation in Gonad Development. **Springer International Publishing**, v. 58, p. 167–190, 2016.

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

RODGERS, R. J.; IRVING-RODGERS, H. F. Morphological classification of bovine ovarian follicles. **Reproduction**, v.139, n.2, p.309-318, 2010.

ROSSETO, R. et al. Advances in isolation and pre-antral follicle culture systems. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.5, n.1, p.15-23, 2011.

ROSSETTO, R. et al. Effect of medium composition on the in vitro culture of bovine pre-antral follicles: morphology and viability do not guarantee functionality. **Zygote**, v.21, p.125–128, 2013.

ROSSI, R. O. D. S. et al. Influence of BMP-2 on early follicular development and mRNA expression of specific oocyte genes in bovine preantral follicles cultured in vitro. **Histol Histopathol**, v.31, p.339-348, 2016.

SADEGHNIA, S. et al. Development of sheep primordial follicles encapsulated in alginate or in ovarian tissue in fresh and vitrified samples. **Cryobiology**, v. 72, p. 100- 105, 2016.

SAEED-ZIDADE, M. et al. Cellular and exosome mediated molecular defense mechanism in bovine granulosa cells exposed to oxidative stress. **Plos One**, v. 12, n. 11, p.1-24, 2017.

SAHEBKAR, A. et al. Effect of curcuminoids on oxidative stress: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 898–909, 2015.

SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochim Biophys Acta**,

v.1822,n.12, p. 1896-1912, 2012.

SANTOS, J. M. S. et al. *Kaempferol* can be used as the single antioxidant in the in vitro culture medium, stimulating sheep secondary follicle development through the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. **Theriogenology**, n. 136, p. 86-94, 2019.

SANTOS, K.J.G. et al. Biotecnologias reprodutivas e fisiologia reprodutiva da fêmea bovina – conhecimento para o sucesso. **PUBVET**, Londrina, v. 6, n. 36, 2012.

SAUMANDE, L.P. et al. Maternal hormonal and follicular relationships in ewes of high and low ovulation rates. **Journal Reproduction Fertility**, v.62, p.141-150, 1981.

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

SHARMA, G. T. et al. Effect of different mechanical isolation techniques on developmental competence and survival of buffalo ovarian preantral follicles. **Livestock Science**, v. 123, p.300-305, 2009.

SHENG, Y.; et al. Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases. **Chem Rev**, v.114, p.3854–3918, 2014.

SHI, W. Q. et al. Association of dietary and serum vitamin E with bone mineral density in middle-aged and elderly Chinese adults: a cross-sectional study. **British Journal of Nutrition**, v.115, p.113–120, 2016.

SHOOREI, H. et al. Effects of *Matricaria chamomilla* extract on growth and maturation of isolated mouse ovarian follicles in a three-dimensional culture system. **Chin Med J**, v.131, p.218–25, 2017.

SILVA, A. W. B. et al. Expression of TNF- α system members in bovine ovarian follicles and the effects of TNF- α or dexamethasone on preantral follicle survival, development and ultrastructure in vitro. **Anim Reprod Sci**, v.182, p.56-68, 2017.

SILVA, G. M. et al. Ascorbic acid improves the survival and in vitro growth of isolated caprine preantral follicles. **Anim Reprod**, v. 8, p. 14-24, 2011.

SILVA, G. M. et al. In vitro development of secondary follicles from pre-pubertal and adult goats cultured in two-dimensional or three-dimensional systems. **Zygote**, v. 23, n.4, p. 475–84. 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.

SILVA, J. R. V. et al. Características morfológicas e controle do crescimento folicular durante a foliculogênese em ruminantes domésticos. **Ciência Animal**, v.12, p.105-117, 2002.

SILVA, J. R.V.; VAN DEN HURK, R.; FIGUEIREDO, J. R. Ovarian follicle development in vitro and oocyte competence: advances and challenges for farm animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v.55, p.123–135, 2016.

- SOHEL, M. 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.
- SOHEL, M. M. H. et al. Exosomal and non exosomal transport of extra-cellular microRNAs in follicular fluid: implications for bovine oocyte developmental competence. **PLoS One**, v. 8, p505, 2013.
- SOUZA, A.L.P. et al. Use of *Aloe vera* based extender for chilling and freezing collared peccary (*Pecari tajacu*) semen. **Theriogenology**, v. 85, n. 8, p. 1432-8, 2016.
- SOUZA, A. C. C. et al. Influência da contagem de folículos antrais na produção in vitro de embriões bovinos de doadoras *Bos indicus* e *Bos taurus* – Revisão de literatura. **Rev Bras Reprod Anim**, v.43, n.1, p.13-17, jan./mar. 2019.
- SOVERNIGO, T. C. et al. Effects of supplementation of medium with different antioxidants during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryoproduction. **Reproduction Domestic Animals**, v. 52, n. 4, p. 561-569, 2017.
- SPITSCHAK, M.; HOEFLICH, A. Potential Functions of IGFBP-2 for Ovarian Folliculogenesis and Steroidogenesis. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, p.1-10, 2018.
- SUMI, F. A. et al. Analysis of the phenolic content of *Aloe vera* gel and evaluation of the effect of Aloe gel supplementation on oxidative stress and fibrosis on cardiac damage administered by isoprenaline in rats. **Prev Nutr. Sci**, v.24, n.3, p.254–264, 2019.
- SUN, J.; LI, X. Growth and antrum formation of bovine primary follicles in long-term culture in vitro. **Reprod Biol**, v.13, n.3, p.221–228, 2013.
- SURAI, P. F.; FISININ, V. I.; KARADAS, F. Antioxidant systems in chick embryo development. Part 1. Vitamin E, carotenoids and selenium. **Animal Nutrition**, v. 2, n. 1, p. 1–11, 2016.
- SUZUKI, N. et al. Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency. **Human Reproduction**, v. 30, p. 608-615, 2015.
- TAKENAKA, M.; HORIUCHI, T.; YANAGIMACHI, R. Effects of light on development of mammalian zygotes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.104, n.36, p.14289-14293, 2007.
- TAMILMANI, G. et al. Nuclear maturation of oocytes in sheep preantral follicles cultured in vitro. **Small Ruminant Research**, v. 60, p. 295–305, 2005.
- TAN, B. L.; NORHAIZAN, M. E.; LIEW, W. P.; SULAIMAN, R. H. Antioxidant and Oxidative Stress: A Mutual Interplay in Age-Related Diseases. **Front Pharmacol**, v.9, 2018.
- VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation with in ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, p. 1717-1751, 2005.
- VAN DER HOEK, K. H. et al. Effects of Interleukin (IL)-6 on Luteinizing Hormone- and IL-1 I-Induced Ovulation and Steroidogenesis in the Rat Ovary. **Biology of Reproduction**, v.58, p.1266-1271, 1998.
- VAN DER VALK, J. et al. Optimization of chemically defined cell culture media-replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. **Toxicology in vitro**, v. 24, n. 4,

p. 1053-1063, 2010.

VANACKER, J.; AMORIM, C. A. Alginate: A Versatile Biomaterial to Encapsulate Isolated Ovarian Follicles. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 45, n. 7, p. 1633– 1649, 2017.

VASCONCELOS, E. M. et al. Eugenol influences the expression of messenger RNAs for superoxide dismutase and glutathione peroxidase 1 in bovine secondary follicles cultured *in vitro*. **Zygote**, v.23, p.19:40, 2021.

VEGA R.G. et al. Selenium levels and Glutathione peroxidase activity in the plasma of patients with type II diabetes mellitus. **J Trace Elem Med Biol**, v.37, p. 44–49, 2016.

VON MENGDEN, L.; KLAMT, F.; SMITZ, J. Redox Biology of Human Cumulus Cells: Conceitos Básicos, Impacto na Qualidade dos Oócitos e Potencial Uso Clínico. **Sinal Redox Antioxidante**, v. 32, n.8, p. 522-535, 2020.

WANG, Z. J. et al. Review on cell models to evaluate the potential antioxidant activity of polysaccharides. **Food & Function**, v. 8, n. 3, p. 915-926, 2017.

WEST E.R. et al. Physical properties of alginate hydrogels and their effects on *in vitro* follicle development. **Biomaterials**, v.28, p.4439–4448, 2007.

WU, J.; TIAN, Q. Role of follicle stimulating hormone and epidermal growth factor in the development of porcine preantral follicle *in vitro*. **Zygote**, v. 15, n. 3, p. 233–240, 2007.

YAGI, A. et al. *In vivo* metabolism of aloemannan. **Plant Med**, v. 65, p.417–420, 1999.

ZELKO, I. N et al. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free radical biology & medicine**, v. 33.3, p.337-49, 2002.

ZHANG, L. et al. Adipose-specific ablation of Nrf2 transiently delayed high-fat diet-induced obesity by altering glucose, lipid and energy metabolism of male mice. **Am J Transl Res**, v.8 p. 5309- 5319, 2016.

ZHANG, S. et al. Simulated Microgravity Using a Rotary Culture System Compromises the *In Vitro* Development of Mouse Pre antral Follicles. **PloS one**, v. 11, n. 3, p. 151-161, 2016.

