

## RESUMO EXPANDIDO

	<p><b>II SEMANA UNIVERSITÁRIA DA UNILAB</b> <b>“Práticas Locais, Saberes Globais”</b></p> <p>I ENCONTRO DE PRÁTICAS DOCENTES E DISCENTES II ENCONTRO DE INICIAÇÃO À DOCÊNCIA II ENCONTRO DE EDUCAÇÃO À DISTÂNCIA III ENCONTRO DE EXTENSÃO, ARTE E CULTURA IV ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA I ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO</p>
---	---

### UTILIZAÇÃO DO CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIIS ISOLADOS PARA AVALIAR E COMPARAR O EFEITO CITOTÓXICO DA FRAÇÃO DA *AUXEMMA ONCOCALYX* (PAU-BRANCO-DO-SERTÃO) E DA ONCOCALYXONA A (QUINONA DA *AUXEMMA ONCOCALYX*)

**Aline de Oliveira de Freitas<sup>1</sup>; Johanna Leiva-Revilla<sup>2</sup>; Laritza Ferreira de Lima<sup>2</sup>; Amiry Monteiro Sanca<sup>1</sup>; José Ricardo de Figueiredo<sup>2</sup>; Juliana Jales de Hollanda Celestino<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências da Saúde, e-mail: [aline96261704@hotmail.com](mailto:aline96261704@hotmail.com), [amiry Monteiro Sanca@outlook.com](mailto:amiry Monteiro Sanca@outlook.com), [juliana.celestino@unilab.edu.br](mailto:juliana.celestino@unilab.edu.br); <sup>2</sup>Universidade Estadual do Ceará, Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais (LAMOFOPA), e-mail: [johileiva@gmail.com](mailto:johileiva@gmail.com), [laritza\\_lima@yahoo.com.br](mailto:laritza_lima@yahoo.com.br), [figueiredo.lamofopa@gmail.com](mailto:figueiredo.lamofopa@gmail.com).

## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da fração de *Auxemma oncoalyx* (AO) e Oncocalyxona A (Onco A) sobre o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais isolados caprinos. Para tanto, realizou-se testes preliminares de viabilidade espermática e de oócitos e o experimento propriamente dito, em que folículos ovarianos foram isolados e cultivados em meio  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> (controle positivo), na ausência ou presença de dimetilsulfóxido (DMSO: 0,5% v/v), da Doxorubicina (DXR 0,3 ng/ml - controle negativo), ou ainda, da AO (1,2  $\mu$ g/ml) ou em 1,0  $\mu$ g/ml da Onco A. Foram avaliados diâmetro, crescimento folicular diário, sobrevivência, extrusão e formação de antro. Os dados foram analisados utilizando o pacote estatístico SAS considerando  $P < 0,05$ . A percentagem de oócitos viáveis na AO foi significativamente inferior ao controle, DMSO e DXR. Com relação ao diâmetro e às percentagens de folículos normais e formação de antro, dados significativamente inferiores

foram encontrados na DXR quando comparado aos demais tratamentos. Em conclusão, oócitos são mais susceptíveis aos efeitos tóxicos da AO e os folículos à DXR.

**PALAVRAS-CHAVE:** Toxicidade, Ovário, *Auxemma oncoalyx*, Oncocalyxona A, Reprodução.

## INTRODUÇÃO

Ao buscar novas drogas, as plantas vêm sendo consideradas excelentes fontes de matéria-prima devido a sua elevada diversidade molecular. Um exemplo disso é a *Auxemma oncoalyx*, planta nativa do Nordeste do Brasil. Alguns estudos vêm sugerindo que ela tem atividades biológicas como analgésica, antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral (FERREIRA et al., 2003). Do cerne do caule desta foram isolados diversos compostos, dentre estes uma quinona denominada Oncocalyxona A (Onco A), com alta atividade antioxidante (FERREIRA et al., 2003) e antiproliferativa de células tumorais (COSTA-LOTUFO et al., 2002), e que, por esse motivo, vem sendo estudada no combate ao câncer. Entretanto, o efeito dessa substância sobre a fertilidade feminina ainda não é conhecido.

Dessa forma, faz-se necessário estudar a ação desse composto sobre o desenvolvimento dos folículos ovarianos. Essa avaliação pode ser realizada utilizando-se o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais (FOPA) caprinos através da técnica chamada Ovário Artificial, importante etapa da biotécnica de Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais (MOIFOPA).

Portanto, este trabalho objetivou avaliar o efeito da quinona Oncocalyxona A, e também da fração de *Auxemma oncoalyx* sobre o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais isolados caprinos.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento propriamente dito foi conduzido no Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais (LAMOFOPA) da Universidade Estadual do Ceará (UECE), durante o período de janeiro a julho de 2015.

A fração da *Auxemma oncoalyx* e a *Onco A* isolada foram fornecidas pelo Laboratório de Fitoquímica de Plantas Medicinais (LAFIPLAM) - Universidade Federal do Ceará (UFC).

Ovários de cabras sem raça definida obtidos de abatedouros locais foram coletados, lavados e transportados ao laboratório em Meio Essencial Mínimo (MEM), com antibióticos e

HEPES à temperatura de 4°C (CHAVES et al., 2008). Destes ovários, foram isolados folículos por meio de microdissecção com auxílio de agulhas 28G.

Antes do cultivo propriamente dito foram realizados testes preliminares de viabilidade espermática e de viabilidade de oócitos.

O cultivo *in vitro* dos FOPAS isolados foi realizado diretamente sobre o plástico com  $\alpha$ -MEM+ suplementado, na ausência ou presença do veículo DMSO (0,5% v/v), da DXR em sua dose tóxica (0,3 ng/ml), ou ainda, do extrato do cerne do caule da *Auxemma* (1,2  $\mu$ g/ml) ou em 1,0  $\mu$ g/ml da *Oncocalyxona A*. Os FOPA secundários avançados foram cultivados individualmente, por 6 dias, em microgotas de 100  $\mu$ l de meio em placas de 60 mm de diâmetro sob óleo mineral, sendo a troca de 60  $\mu$ l de meio realizada a cada 2 dias. Após o cultivo, estes foram classificados de acordo com a sua morfologia em normais ou degenerados e também avaliados quanto ao seu diâmetro, extrusão e formação de cavidade antral.

Todos os dados foram analisados utilizando o pacote estatístico SAS considerando  $P < 0,05$ , e os testes empregados foram Qui-quadrado, Kruskal-Wallis e o Exato de Fisher.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação à viabilidade espermática, verificou-se uma diminuição da porcentagem de espermatozoides vivos com o aumento do tempo de exposição, e uma menor porcentagem de espermatozoides vivos foi também observada na presença da quinona *Oncocalyxona A*.

A Tabela 1 abaixo mostra a porcentagem de oócitos vivos e mortos após utilização de diferentes tratamentos. Os resultados mostraram então uma toxicidade maior no extrato da *Auxemma oncocalyx* do que quando utilizada a quinona *Oncocalyxona A* isolada do extrato.

Tabela 1 – Porcentagem (n/total) de oócitos após maturação *in vitro* em TCM-199 bicarbonato sozinho (Controle) ou suplementado com dimetilsulfóxido (DMSO), doxorubicina (DXR), *Oncocalyxona A* (Onco A) ou *Auxemma oncocalyx* (*A. oncocalyx*).

Tratamentos	Nº oócitos	Vivos	Mortos
Controle	75	94,67 (71/75) <sup>a</sup>	5,33 (4/75) <sup>c</sup>
DMSO	85	89,41 (76/85) <sup>ab</sup>	10,59 (9/85) <sup>bc</sup>
DXR	79	83,54 (66/79) <sup>b</sup>	16,46 (13/79) <sup>b</sup>
Onco A	77	80,52 (62/77) <sup>bc</sup>	19,48 (15/77) <sup>ab</sup>
<i>A. oncocalyx</i>	86	67,44 (58/86) <sup>c</sup>	32,56 (28/86) <sup>a</sup>

Diferentes letras minúsculas sobrescritas representam diferenças significativas entre linhas (tratamentos experimentais).  $P < 0,05$

Tabela 2 – Taxa de crescimento diário  $\pm$  D.P. e percentagens (n/total) de folículos normais, extrusos e de formação de antro de folículos isolados caprinos cultivados *in vitro* por 6 dias em alfa-Meio Essencial Mínimo (Controle) sozinho ou suplementado com dimetilsulfóxido (DMSO), doxorubicina (DXR), *Auxemma oncocalyx* (*A. oncocalyx*) ou *Oncocalyxona A* (Onco A).

Parâmetros	Controle	DMSO	DXR	<i>A. oncocalyx</i>	Onco A
Cresc./dia	4,60 $\pm$ 6,32 <sup>A</sup>	3,58 $\pm$ 7,31 <sup>A</sup>	-1,18 $\pm$ 4,63 <sup>B</sup>	4,49 $\pm$ 7,10 <sup>A</sup>	2,24 $\pm$ 7,27 <sup>A</sup>
Normais (%)	93,33 (56/60) <sup>A</sup>	91,38 (53/58) <sup>A</sup>	64,41 (38/59) <sup>B</sup>	88,14 (52/59) <sup>A</sup>	86,44 (51/59) <sup>A</sup>
Extrusos (%)	1,67 (1/60) <sup>A</sup>	3,45 (2/58) <sup>A</sup>	1,69 (1/59) <sup>A</sup>	1,69 (1/59) <sup>A</sup>	1,69 (1/59) <sup>A</sup>
Antro (%)	48,33 (29/60) <sup>A</sup>	41,38 (24/58) <sup>A</sup>	11,86 (7/59) <sup>B</sup>	40,68 (24/59) <sup>A</sup>	38,98 (23/59) <sup>A</sup>

Letras maiúsculas sobrescritas distintas representam diferenças significativas entre colunas.  $P < 0,05$

Já com relação ao diâmetro médio dos FOPA caprinos isolados nos diferentes tratamentos, observou-se que no dia 0 de cultivo não houve diferença significativa entre estes. Após 6 dias de cultivo, verificou-se um diâmetro significativamente inferior no tratamento

com DXR (controle negativo). Com a progressão do cultivo de 0 para 6 dias, houve um aumento significativo no diâmetro folicular em todos os tratamentos, exceto na presença da Doxorubicina e da Oncocalyxona A.

A Tabela 2 acima mostra a taxa de crescimento diário dos folículos, e as percentagens de folículos normais, extrusos e de formação de antro. A DXR no cultivo agiu negativamente na taxa de crescimento diário, não acontecendo o mesmo para os demais tratamentos. Mesmo após 6 dias de cultivo, todos tratamentos promoveram altas taxas de sobrevivência folicular em torno de 90%, exceto na DXR ( $\pm 60\%$ ). Já a percentagem de folículos extrusos não diferiu entre os diferentes tratamentos, e no que se refere à formação de antro, observou-se uma percentagem significativamente inferior no tratamento DXR, quando comparado aos demais tratamentos.

## CONCLUSÕES

Em conclusão, o presente estudo mostrou que os oócitos são mais susceptíveis aos efeitos tóxicos da *Auxemma oncoalyx* do que da Oncocalyxona A, e os folículos da Doxorubicina. Mais estudos são necessários para tentar desvendar o mecanismo de ação dessas substâncias sobre a fertilidade feminina, especialmente sobre a foliculogênese.

## REFERÊNCIAS

- CHAVES, R. N. et al. Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured *in vitro*. **Reproduction Fertility and Development**, v. 20, p. 640-647, 2008.
- COSTA-LOTUFO, L. V. et al. Toxicity to sea urchin egg development of the quinone fraction obtained from *Auxemma oncoalyx*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 927-930, 2002.
- FERREIRA, M. A. D. et al. Antioxidant effects in the quinone fraction from *Auxemma oncoalyx* Taub. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, p. 595-599, 2003.