



IV ENCONTRO INTERNACIONAL DE BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE HUMANA E ANIMAL:

AVANÇOS E TENDÊNCIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA SAÚDE HUMANA E ANIMAL

EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DE ROMÃ SOBRE A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM TECIDO OVARIANO BOVINO CULTIVADO *IN VITRO*

Sara Rany Alexandre Bittencourt¹; Alesandro Silva Ferreira²; Maria Alice Felipe Oliveira³; Isabele da Silva Pereira⁴; Jonathan Elias Rodrigues Martins⁵; Solano Dantas Martins⁶; Ernando Igo Teixeira de Assis⁷; Vânia Marilande Ceccatto⁸; Valdevane Rocha Araújo⁹.

¹Graduanda em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza-CE; ²Graduando em Farmácia pela Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB), Redenção, CE; ³Mestranda pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGB) da Universidade Federal do Ceará (UFC), Sobral-CE; ⁴Mestre pelo PPGB/UFC, Sobral-CE; ⁵Doutorando pela Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Fortaleza-CE; ⁶Mestrando pelo PPGB/UFC, Sobral-CE; ⁷Doutorando pela RENORBIO, Sobral-CE; ⁸Docente do curso de Ciências Biológicas da UECE, Fortaleza-CE; ⁹Docente do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAr), Parnaíba-PI e do PPGB/UFC, Sobral-CE.
salaranybittencourt@gmail.com

RESUMO

A manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais permite recuperar folículos ovarianos pré-antrais com o objetivo de tornar seus oócitos competentes para utilização em outras técnicas reprodutivas. Contudo, um dos principais fatores limitantes dessa técnica é o excesso de EROs produzidos durante o cultivo *in vitro* e, levando a peroxidação lipídica. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do extrato etanólico de romã sobre a peroxidação lipídica em fragmentos ovarianos bovinos cultivados *in vitro*. Para isso, ovários de vacas (n=12) foram coletados em abatedouro local e transportados ao laboratório. No laboratório, os ovários foram fragmentados, sendo 1 fragmento imediatamente fixado, compondo o controle fresco não cultivado (CTRL-F) e os demais destinados ao cultivo *in vitro* na ausência (CTRL-C) ou presença de diferentes concentrações (10, 50 ou 100 µg/mL) do extrato etanólico do exocarpo da romã. O cultivo foi realizado durante 6 dias, a 38.5°C, realizando-se trocas parciais a cada 48h, sendo o cultivo feito em placa de 24 poços, onde cada poço foi colocado 500 µL de meio α -MEM suplementado. Após o cultivo *in vitro*, os fragmentos foram avaliados quanto ao conteúdo de malondialdeído (MDA). Observou-se que os fragmentos cultivados na presença de 50 e 100 µg/mL de extrato etanólico reduziram os níveis de MDA, quando comparados ao CTRL-C e a concentração de 10 µg/mL de extrato. Desta forma, pode-se concluir que o extrato etanólico de romã (*Punica granatum*) diminui a peroxidação lipídica de fragmentos ovarianos bovinos após o cultivo *in vitro*.

PALAVRAS-CHAVE: Peroxidação lipídica; Estresse oxidativo, Folículos pré-antrais; Cultivo *in vitro*.

1 INTRODUÇÃO



A manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA) permite recuperar os folículos ovarianos pré-antrais, para obter números de oócitos competentes (PIVE; FIGUEIREDO et al., 2019). No entanto, há dificuldade em se produzir bons resultados com essa técnica, e um dos fatores associados é o estresse oxidativo, que pode causar danos aos componentes celulares, especialmente as membranas celulares através da peroxidação lipídica (CHOI *et al.*, 2008).

A peroxidação lipídica é um conjunto de reações entre os ácidos graxos poliinsaturados, como os fosfolípidos da membrana celular, com oxigênio (ABUJA, ALBERTINI, 2001). Devido a peroxidação, as células sofrem alterações estruturais e funcionais na membrana celular como: alteração no fluxo de íons e perda da seletividade a diferentes substâncias (AYALA, MUÑOZ & ARGUELLES, 2014). Ainda, a peroxidação lipídica resulta na formação de diferentes substâncias, como o malondialdeído (MDA), um produto secundário e biomarcador de estresse oxidativo (COSTA et al., 2022). Como estratégia para minimizar os efeitos deletérios do estresse oxidativo e consequente peroxidação lipídica, a adição de extratos de plantas no meio de cultivo tem se destacado como uma estratégia promissora, por sua praticidade e baixo custo.

Nesse sentido, a *Punica granatum*, popularmente conhecida como romã, destaca-se principalmente devido a sua alta atividade antioxidante (TOI, 2003; TZULKER, 2007; NAVEENA *et al.*, 2008). A *Punica granatum* L. pertence à família *Lyteraceae*, cujo gênero é *Punica* L. A *P. granatum*. A romã tornou-se uma planta largamente utilizada na medicina popular para o tratamento de diversas desordens (Saeed et al., 2018). Estudos já foram realizados com soluções de diferentes partes da planta, onde foi evidenciada a capacidade de modular o ciclo estral e foliculogênese, estresse oxidativo, atividade antioxidante, regular níveis hormonais e de citocinas (ABEDINI *et al.*, 2020). Apesar disso, os possíveis efeitos benéficos da romã, especialmente seu potencial antioxidante, ainda não foram investigados no cultivo *in vitro* de tecido ovariano bovino.

2 OBJETIVO

O presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos das concentrações 10, 50 e 100 µg/mL do extrato etanólico da casca do fruto de romã sobre os níveis de malondialdeído (MDA) em tecido ovariano bovino cultivado *in vitro* durante 6 dias.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE; nº 09326942/2021). Ovários (n=16) de vacas adultas e sem

padrão racial definido foram coletados em abatedouro local e transportados ao laboratório em até 2 horas em salina fisiológica (NaCl a 0,9%) adicionada de penicilina (100 µg/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) à 4°C. Cada par de ovários foi dividido em fragmentos de 3x3x1 mm, sendo colocados, aleatoriamente, em placa de 24 poços com 500 µL de meio base α -MEM⁺.

O cultivo foi realizado durante 6 dias, sendo mantido a uma temperatura de 38.5°C com concentrações de extrato do exocarpo, fruto de *Punica granatum*, realizando-se trocas parciais a cada 48h, sendo o cultivo feito em placa de 24 poços, onde cada poço foi colocado 500 µL de meio α -MEM suplementado.

A dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, avalia o produto final da peroxidação lipídica da membrana, malondialdeído (MDA). O homogenato de tecido ovariano (63 µL) foi adicionado ao (100 µL) ácido perclórico a 35%. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (5.000 rpm, 10 min, 4 °C) e realizado o aquecimento (95°C, 30 min); ao sobrenadante (150 µl) foram adicionados o TBARS (50 µl, a 1,2%). As leituras foram obtidas em A_{535 nm} (Cighetti *et al.*, 1999).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que após o cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos bovinos por 6 dias, os níveis de MDA foram significativamente inferiores nas concentrações de 50 e 100 µg/mL (Figura 1), quando comparadas ao tratamento controle cultivado (P<0,05). Além disso, tais concentrações apresentaram níveis de MDA semelhantes ao tecido fresco (P>0,05).

Figura 01

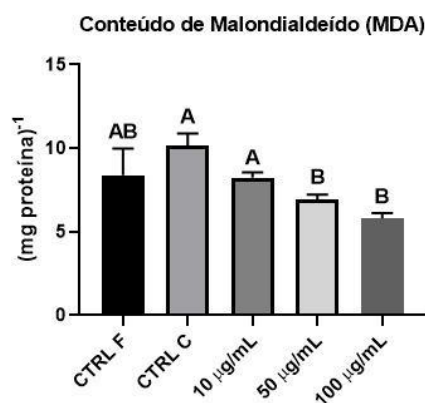


Figura 01. Conteúdo de malondialdeído na ausência (controle fresco-CTRL F e controle cultivado-CTRL C) e presença de diferentes concentrações do extrato etanólico de *Punica granatum* (10 µg/mL, 50 µg/mL ou 100 µg/mL) em tecido ovariano bovino no dia 6 de cultivo *in vitro*. ^{ABC} Letras diferentes representam diferenças significativas entre os diferentes tratamentos no mesmo dia de cultivo (p<0.05).



Este foi o primeiro trabalho a evidenciar os efeitos do extrato etanólico de romã sobre os níveis de MDA em fragmentos ovarianos bovinos cultivados *in vitro*. A romã possui uma alta quantidade de composto fenólicos e seus efeitos antioxidantes diretos podem ser devido a presença de grupos funcionais hidroxila em torno de sua estrutura nuclear, os quais são potentes doadores de hidrogênio (KULKARNIA, ARADHYAA, DIVAKARB, 2004). Assim, como em nosso estudo, Boldaji et al. (2020) evidenciaram que o suco da romã foi capaz de reduzir os níveis de MDA. A redução do MDA pode estar relacionada à estimulação da atividade antioxidante intracelular promovida pela romã, aparentemente através da ativação da via AMPK (BOLDAJI et al., 2020). Além disso, outros autores também evidenciaram o papel de extratos romã em combater o estresse oxidativo nos sistemas reprodutivos em fêmeas e machos (YAYLA et al., 2018; KHALAF *et al.*, 2019).

5 CONCLUSÃO

Em conclusão, a utilização do extrato etanólico de romã (*Punica granatum*), especialmente nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, foi eficaz em promover redução nos níveis de MDA após o cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos bovinos.

REFERÊNCIAS

- AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGUELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*, v.2014, p.1-31, 2014.
- BOLDAJI, R.B., AKHLAGHI, M., SAGHEB, M.M., ESMAEILINEZHAD, Z. Pomegranate juice improves cardiometabolic risk factors, biomarkers of oxidative stress and inflammation in hemodialysis patients: a randomized crossover trial. *J. Sci. Food Agric.* v.100(2), 846-854, 2020.
- COSTA, F. C.; VASCONCELOS, E. M.; SILVA, J. R. V.; BATISTA, A. L. P. S. Influência das espécies reativas de oxigênio durante o cultivo *in vitro* de oócitos e folículos ovarianos de mamíferos domésticos. *Rev Bras Reprod Anim*, v. 46, n. 1, p. 28-42, 2022.
- KHALAF, H.A., ARAFAT, E.A., GHONEIM, F.M. A histological, immunohistochemical and biochemical study of the effects of pomegranate peel extracts on gibberellic acid induced oxidative stress in adult rat testes. *Biotech. Histochem.*, v.94(8), p.569-582, 2019.
- YAYLA, M.; CETIN, D.; ADALI, Y.; KILICLE, P. A.; TOKTAY, E. Potential therapeutic effect of pomegranate seed oil on ovarian ischemia/reperfusion injury in rats. *Iran J Basic Med Sci.* 21:1262-8. 2018.