



**UTILIZAÇÃO DO EXTRATO NANOEMULSIONADOS DE *Phyllanthus amarus* Schumn. & Thonn. VEICULADO EM SISTEMAS NANOESTRUTURADOS COMO MEIO DE CULTIVO DE FOLÍCULOS OVARIANO SUPLEMENTADOS COM: FSH e VEGF.**

Nathalia Napoli Mendes<sup>1</sup>; Gustavo Napoli Mendes<sup>1</sup>; Luís Felipe Tarasiuk Firmino<sup>1</sup>; Marina Gabriella Silva Sales<sup>1</sup>; Raquel de Araújo Leão<sup>1</sup>; Yasmin Marques Fagundes Protásio<sup>1</sup>; Rafaela Vanderlei de Souza Lima<sup>1</sup>; Mylena Cordeiro Aranha<sup>1</sup>; Matheus de Medeiros Dantas<sup>1</sup>; Larissa Dantas de Medeiros<sup>1</sup>; Gabriela Soares da Silva<sup>1</sup>; Letícia Maria Fernandes Pereira<sup>1</sup>; Ranna Joyce Oliveira de Araújo<sup>1</sup>; Ana Beatriz dos Santos Silva<sup>1</sup>; (Dra.) Maria Aparecida Medeiros Maciel<sup>1</sup>; (Dra.) Deborah de Melo Magalhães<sup>1</sup>.

Universidade Potiguar <sup>1</sup>  
nathalianapolimendes@hotmail.com

## **RESUMO**

A composição do meio de cultivo é determinante para o sucesso da maturação e desenvolvimento folicular in vitro, porém meios comerciais como  $\alpha$ -MEM e TCM-199 apresentam elevado custo. Diante disso, este estudo avaliou o potencial do extrato nanoemulsionado de *Phyllanthus amarus* como alternativa biotecnológica de baixo custo para o cultivo de folículos pré-antrais caprinos. Ovários de cabras foram

coletados em abatedouro, higienizados e submetidos à microdissecção para isolamento de folículos secundários morfológicamente normais. O extrato vegetal foi incorporado em microemulsão (SMECHA) e comparado a  $\alpha$ -MEM suplementado, ambos associados ou não aos hormônios FSH e GH e aos fatores de crescimento VEGF e IGF-I, totalizando quatro tratamentos. Os folículos foram cultivados individualmente por 18 dias, com avaliações de viabilidade via microscopia de fluorescência. Os resultados demonstraram ausência de diferença estatística na viabilidade entre MEM e SMECHA, indicando que o extrato nanoemulsionado apresenta eficácia semelhante ao meio comercial, atingindo aproximadamente 70% de viabilidade. Conclui-se que *Phyllanthus amarus*, especialmente quando suplementado com FSH e VEGF, constitui um meio promissor para cultivo in vitro, mantendo a viabilidade folicular a menor custo, configurando uma alternativa viável para pesquisas em reprodução assistida.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Phyllanthus amarus* , Cultivo in vitro , Folículos pré-antrais

## INTRODUÇÃO

Um dos pontos chaves para o sucesso do cultivo *in vitro* no processo de Reprodução Assistida é a composição do meio de base. Comercialmente, vários são os meios utilizados na literatura, destacando-se dentre eles o  $\alpha$ MEM e o TCM 199. Entretanto, estes meios possuem um custo elevado, limitando, desta forma, a pesquisa científica. Uma solução para este problema seria a utilização de extratos fitoterápicos como meio de cultivo de base. Dentre esses fitoterápicos, destaca-se a *Phyllanthus amarus* Schumn. & Thonn, por suas propriedades antioxidante, antimicrobiana, antifúngica, dentre outras, que lhe são atribuídas (Maciel et al., 2019). Uma das formas de minimizar o efeito tóxico das plantas é veicular o extrato em nanoemulsão, técnica bastante eficaz na biotecnologia que possibilita potencializar o efeito das substâncias diminuindo a concentração, ou seja, diminuindo a toxicidade do produto. O conhecimento acerca da expressão de fatores e hormônios envolvidos no processo de

desenvolvimento folicular, bem como as interações desses em cada uma das fases da foliculogênese é extremamente necessário para que possam ser desenvolvidas estratégias de cultivo que busquem otimizar a produção *in vitro* de embriões a partir de folículos pré-antrais. Recentemente, foram feitas algumas descobertas pela nossa equipe do efeito da *Phyllanthus amarus Schumn. & Thonn* como meio de cultivo celular (gerou uma patente BR102017012286-7), o que deixou a perspectiva que essa planta seria uma opção viável para minimizar o custo que se tem *in vitro*. Além de alcançar resultados satisfatórios de viabilidade folicular ovariana, devido a seus efeitos antioxidante, principalmente quando associada a outras substâncias, essa planta possui efeitos antibacterianos e antifúngicos, não necessitando da adição dessas substâncias ao extrato, tendo em vista que elas podem causar um efeito tóxico para as células em cultivo. Com o intuito de elaborar um sistema eficiente de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, maturação oocitária e posterior produção *in vitro* de embriões, diversas estratégias podem ser utilizadas. Contudo, é ausente em todas as espécies, estudos que investigam o efeito da associação do *Phyllanthus amarus Schumn. & Thonn* suplementado com hormônios (FSH e GH) e fatores de crescimento (VEGF e IGF-I) sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos ovarianos. Quando adicionado em meio de cultivo comercial MEM, o VEGF proporcionou um aumento de oócitos que retomaram a meiose (maturados) (ARAUJO et al., 2018) e o FSH quando adicionado ao meio comercial MEM em cultivo *in vitro* folicular, promoveu a ativação e crescimento de folículos pré-antrais, bem como a formação do antro e secreção do hormônio estradiol, constatados nas espécies caprina, ovina, bovina, bubalina e equina (MAGALHAES et al., 2009).

## MÉTODOS

Ovários (n=10) oriundos de cabras adultas sem padrão racial definido (SPRD) foram coletados em abatedouros locais. Após a coleta, os ovários foram lavados em álcool 70% e, em seguida, duas vezes em Meio Essencial Mínimo (MEM®) acrescido de HEPES® (solução tampão) e antibióticos (75 mg/L de penicilina e 50 mg/L de

estreptomicina). Por fim, os ovários foram transportados até o laboratório em MEM a 4 °C, no período de 1 hora. No laboratório, folículos secundários com diâmetro acima de 100 µm (folículos pré-antrais avançados - FPA) foram isolados dos ovários por meio de microdissecção com auxílio de agulhas. O procedimento consistiu em retirar cortes finos do córtex ovariano (1-2 mm de espessura), colocá-los em meio de fragmentação ( $\alpha$ -MEM adicionado de HEPES) e, através da visualização em estereomicroscópio (SMZ 645 Nikon, Tóquio, Japão), os folículos foram isolados manualmente com auxílio de agulhas 26 gauge (26 G) acopladas em seringas hipodérmicas, lavados e colocados em placas de cultivo. Somente foram utilizados folículos considerados morfolologicamente normais, sem retração oocitária e com células da granulosa bem-organizadas e aderidas a uma membrana basal intacta. Para a obtenção do bioformulado de *Phyllanthus amarus* Schumn. & Thonn, a microemulsão foi preparada com base nos sistemas coloidais do tipo óleo em água (O/A), e utilizou um tensoativo da classe dos sorbitanos (Tween 80) e um óleo vegetal (adquirido comercialmente) que contém os seguintes constituintes químicos: ácido oléico, ácido linoléico, ácido linolênico, poliinsaturados, gordura saturada e vitamina E. Após caracterizações físico-químicas da ME e veiculação do extrato CHA, foi obtido o bioformulado SMECHA (sistema automicroemulsionado veiculador do extrato CHA. O meio utilizado no cultivo *in vitro* foi constituído por MEM, HEPES, ácido ascórbico (50 ng/ml) e BSA 3,0 mg/mL. Foram utilizados dois meios de cultivo base: 1)  $\alpha$ -MEM suplementado com ácido ascórbico (50 ng/ml), BSA 3,0 mg/mL, 2 mM de glutamina, 2 mM de hipoxantina e ITS, 50 ng/mL de GH e 50 ng/mL de IGF-I; 2) Extrato nanoemulsionado de *Phyllanthus amarus* Schumn. & Thonn suplementado com 50 ng/mL de GH e 50 ng/mL de IGF-I. Aos meios de cultivo de base foram adicionadas as substâncias FSH (50 ng/mL) e VEGF (100 ng/m), totalizando 4 tratamentos. Para cada tratamento foram cultivados, no mínimo, 30 folículos. Os folículos obtidos por microdissecção, após a seleção foram individualmente cultivados em microgotas de 100 µL de meio de cultivo em placas de Petri cobertas com óleo mineral (1 folículo/microgota) e mantidas por 18 dias em estufa a 39 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. A cada dois dias, 60 µL do meio de cultivo fresco foram adicionados ao meio existente. Para a análise da viabilidade folicular dos folículos pré-antrais isolados por microdissecção, após o período de cultivo, foi utilizada

a microscopia de fluorescência com marcadores vitais (4  $\mu\text{M}$  de calceína-AM, 2  $\mu\text{M}$  de etídio homodímero-1 e 10  $\mu\text{M}$  de Hoechst 33342) a 37 °C por 15 minutos. Os oócitos e células da granulosa foram considerados viáveis se o citoplasma e núcleo estavam corados positivamente pela calceína-AM (verde) e sem coloração com etídio homodímero-1 (vermelho). O Hoechst foi usado para marcar todos os núcleos em cada folículo, para contar o número total de células e calcular o número de células vivas. Os folículos pré-antrais foram classificados como viáveis, quando o oócito e mais de 10% das células da granulosa estiverem viáveis, e como não viáveis, quando o oócito e/ou mais que 10% das células da granulosa estavam mortas.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Não houve diferença estatística na viabilidade folicular entre os grupos cultivados com MEM sozinho ou suplementado com hormônios e os tratamentos com Extrato nanoemulsionado de *Phyllanthus amarus Schumn. & Thonn* com e sem hormônios, o que possibilita o uso do fitoterápico como um meio de cultivo eficaz (aproximadamente 80% (tratamentos com MEM e 70% (tratamentos com o fitoterápico, respectivamente).

## CONCLUSÃO

Diante do exposto, foi possível concluir que Extrato nanoemulsionado de *Phyllanthus amarus Schumn. & Thonn* suplementado com FSH e VEGF são consideráveis mais viáveis do que o meio comercial MEM, também com os mesmos suplementos, como meio de cultivo de base devido a manutenção da viabilidade folicular a um menor custo.

## **REFERÊNCIAS**

Maciel MAM, Conceição-Anjos G, Revoredo SM, Magalhães-Padilha DM, Ramalho HMM. Botanic, Phytochemistry and pharmacological aspects of *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. as powerful tools to improve its biotechnological studies, 2019; 1(2):  
Doi: 10.31031/ACSR.2019.01.000510.

## **FOMENTO**

O projeto está vinculado ao Programa PróCiência do Ecossistema Ânima pela Universidade Potiguar.