

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**DIANA CAROLINA SAAVEDRA PLAZAS**

**EFEITO DOS EXTRATOS DE *Spirulina maxima* E *Kefir* NO CULTIVO DE  
FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS DE SUINO**

**CURITIBA**

**2015**

**DIANA CAROLINA SAAVEDRA PLAZAS**

**EFEITO DOS EXTRATOS DE *Spirulina maxima* E *Kefir* NO CULTIVO DE  
FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS DE SUINO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, área de saúde humana e animal, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre

Orientador: Professor Dr. Carlos Ricardo Soccol

Co-orientador: Professor Dr. José Ricardo Figueiredo

**CURITIBA**

**2015**

---

P722e

Plazas, Diana Carolina Saavedra

Efeito dos estratos de *Spirulina maxima* e Kefir no cultivo de folículos pré-antrais de suíno/ Diana Carolina Saavedra Plazas. – Curitiba, 2015.

47 f. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2015.

Orientador: Carlos Ricardo Soccol – Co-orientador: José Ricardo Figueiredo.

Bibliografia: p. 26-32.

1. Suíno (fêmea) - Reprodução. 2. Cianobacteria. 3. Lactobacilo. 4. Fertilização in vitro. I. Universidade Federal do Paraná. II. Soccol, Carlos Ricardo. III. Figueiredo, José Ricardo. IV. Título.

CDD: 571.862

---



## RELATÓRIO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

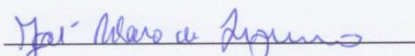
Aos vinte e quatro dias do mês de Abril de 2015, no Salão Nobre do prédio de Administração, no Setor de Tecnologia do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, foi instalada pela Profa. Dra. Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, a banca examinadora para a Centésima Primeira Defesa de Dissertação de Mestrado, área de concentração: Agroindústria e Biocombustíveis. Estiveram presentes no Ato, além da Vice-Coordenadora do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes.

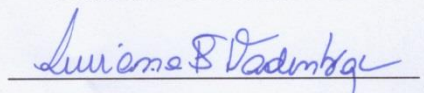
A Banca Examinadora, atendendo determinação do Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, ficou constituída pelos membros: Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo (UECE – Co-orientador da Dissertação), Profa. Dra. Luciana Porto de Souza Vandenberghe (UFPR), Prof. Dr. Romildo Romualdo Weiss (UFPR), Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol (UFPR) e Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol (UFPR – orientador da dissertação).

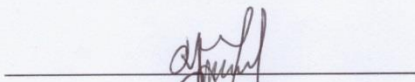
Às 09h00, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **Diana Carolina Saavedra Plazas** a fazer a apresentação da dissertação intitulada: “EFEITO DOS EXTRATOS DE *Spirulina maxima*, Kefir e *Ganoderma lucidum* NO CULTIVO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIIS DE SUINO”. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes.

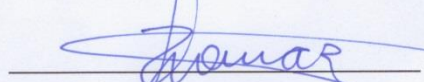
Tendo em vista a dissertação e a arguição, a banca composta pelos membros Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo, Profa. Dra. Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Prof. Dr. Romildo Romualdo Weiss, Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol e Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol, declarou a candidata APROVADA (de acordo com a determinação dos Artigos 59 a 68 da Resolução 65/09 de 30.10.09).


Curitiba, 24 de Abril de 2015.

  
Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo

  
Profa. Dra. Luciana P. S. Vandenberghe

  
Prof. Dr. Romildo Romualdo Weiss

  
Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol

  
Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

## **AGRADECIMENTOS**

À equipe LAMOFOPA da Universidade Estadual do Ceará e o apoio do programa de pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná.

## RESUMO

Em reprodução de mamíferos, sabe-se que 99,9% dos folículos pré-antrais serão eliminados durante a vida reprodutiva das fêmeas. A recuperação dessas estruturas é importante para solucionar problemas de infertilidade e aumentar o potencial reprodutivo das fêmeas. Para isso é necessário desenvolver meios de cultivo ideais com propriedades que possam incrementar o número e desenvolvimento desses folículos. Nesse contexto o objetivo desse estudo foi avaliar a atividade de dois extratos naturais produzidos com *Spirulina maxima* e *Kefir* na manipulação de oócitos *in vitro* (MOIFOPA). Os ovários de 10 fêmeas suínas pré-púberes foram obtidos em abatedouro e manipulados em laboratório para o cultivo *in vitro* do tecido do córtex ovariano na presença de diferentes concentrações (10, 50, 100 e 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do extrato aquoso de *Spirulina maxima* e do extrato liofilizado de *Kefir* pelo período de um e sete dias. O grupo controle foi representado pelo tratamento semelhante aos demais com exceção da adição das substâncias testadas. Os estratos também foram caracterizados e analisados para determinar sua concentração de proteínas, carboidratos e lipídeos por HPSEC-MALLS e SDS-PAGE. Na caracterização dos extratos de *S. maxima* e de *Kefir* foi detectado total de 48,85 e 30,87% de proteínas, respectivamente. No cultivo de tecido ovariano para manipulação de oócitos *in vitro* (MOIFOPA) não foi observada citotoxicidade para o desenvolvimento de folículos pré-antrais, nas duas substâncias estudadas, sendo que o *Kefir* foi mais eficiente do que a *S. maxima*.

Palavras chave: Folículos pré antrais, suíno.

## ABSTRAC

In reproduction of mammals 99.9% of preantral follicles are produced and released during reproductive stage of females. Retrieving of these follicles is important to confront infertility problems to increase the reproductive potential of females. Given this scenario developing ideal culture medias with nutritional properties which might increase the number and development of these follicles is necessary. The aim of this study was evaluate the activity of two natural extracts, one produced by the "blue-green algae" *Spirulina maximum* and "Kefir" in the biotechnique of the Manipulation of Oocytes Enclosed in Preantral Follicles (MOEPF). Each extract were characterized and analyzed to determine proteins, carbohydrates and lipids concentrations by the method HPSEC-MALLS and SDS-PAGE. *S. maxima* extracts has 48.85% of proteins and "Kefir" had 30.87% proteins. Each extract were tested in ten ovarian cortex tissues from prepubertal swine obtained from a slaughterhouse. Cortex tissue were cultivated in vitro culture and citotoxicity were tested with different concentrations (10, 50, 100 and 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) of *Spirulina maxima* aqueous extract and lyophilized extract of "Kefir" in periods of one and seven days each. The control group was not submitted to extracts but periods were the same. In ovarian tissue culture oocytes in vitro manipulation (MOEPF) cytotoxicity was not observed. For the development of preantral follicles in the two substances studied "Kefir" was more efficient than *S. maximum*.

Key words: preantral follicles, swine, oocytes.

## RESUMEN

En la reproducción de los mamíferos 99,9% de los folículos pre-antrales son eliminados durante la vida reproductiva de las hembras. La conservación de estas células es importante para resolver problemas de salud como la infertilidad además de incrementar el éxito reproductivo, siendo así necesario desarrollar medios de cultivo ideales con propiedades que puedan potenciar los ciclos reproductivos estimulando un mayor número de folículos preovulatorios. En este sentido el objetivo de este estudio fue evaluar la actividad de dos extractos naturales producidos con *Spirulina maxima* e *Kefir* en la manipulación de ovocitos *in vitro*. Para esto, se tomaron los ovarios de 10 hembras porcinas prepúberes, luego del sacrificio. El córtex de cada ovario se cultivó suplementando el medio con uno de los dos extractos naturales, para intentar estimular el desarrollo de los folículos preantrales. La adición de cada extracto fue de 10, 50, 100 y 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  por un periodo de un día y un periodo de siete días. El grupo control fue representado por las muestras cultivadas sin la presencia de los extractos de *S. máxima* y *Kefir*. Los extractos también fueron analizados y caracterizados para determinar su concentración de proteínas, carbohidratos y lípidos por HPSEC-MALLS e SDS-PAGE. En la caracterización de los extractos de *S. máxima* y *Kefir* fueron detectados un total de 48,85 y 30,87% de proteínas, respectivamente. Mientras que en el cultivo de tejido de ovario para manipulación de ovocitos *in vitro* (MOIFOPA) no fue observada citotoxicidad en el desarrollo de los folículos pre-antrales, siendo el *kéfir* más eficiente que *S. máxima*.

Palabras clave: Folículos pre-antrales, porcino, ovocitos.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Diferenças entre folículos pré-antrais morfologicamente normais e degenerados após adição dos extratos *Spirulina maxima* e Kefir no cultivo, 2015. .... 15

Figura 2. Classificação dos diferentes folículos pré-antrais segundo HULSHOF et al., 1994 observados em lâminas histológicas de tecido ovariano de suíno, 2015. .... 16

Figura 3- A, Percentuais de desenvolvimento de folículos primordiais de porcas nos dias zero a sete com diferentes concentrações de extrato de *Spirulina maxima* e Kefir. B, Percentuais de folículos pré antrais suínos em desenvolvimento nos dias zero a sete com diferentes concentrações de extratos de *Spirulina maxima* e *Kefir*. .... 20

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Percentual médio  $\pm$  desvio padrão da concentração de carboidratos, lipídeos e proteínas solúveis de extrato de *Spirulina maxima* e Kefir..... 17

Tabela 2- Percentual de sobrevivência de folículos pré-antrais de suínos nos dias zero a sete com diferentes concentrações de extratos de *Spirulina maxima* e Kefir e grupos controle. .... 18

Tabela 3- Percentual de diâmetros dos folículos pré-antrais suínos após cultivo *in vitro* de 1 e 7 dias com diferentes concentrações( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) de *Spirulina maxima*, Kefir e grupo controle. .... 21

Tabela 4- Percentual de diâmetros dos oócitos pré-antrais suínos após cultivo *in vitro* de 1 e 7 dias com diferentes concentrações( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) de *Spirulina maxima* e Kefir, e grupo controle. .... 21

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1. EXTRATOS NATURAIS NO DESENVOLVIMENTO DE FOLICULOS PRÉ-ANTRAIAS                                     | 1  |
| 1.1. FOLICULOGÊNESE .....   | 1  |
| 1.2. FORMAÇÃO E CRESCIMENTO DO FOLÍCULO PRIMORDIAL.....   | 2  |
| 1.3. FOLÍCULOS SECUNDÁRIOS .....  | 2  |
| 1.4. FOLÍCULOS TERCEÁRIOS .....   | 3  |
| 1.5. DINÂMICA FOLICULAR EM SUÍNOS .....   | 3  |
| 1.6. CULTIVO IN VITRO DE OÓCITOS INCLUSOS NOS FOLICULOS PRÉ-ANTRAIAS (FOPA).....                      | 4  |
| 1.7. HORMÔNIOS NECESSÁRIOS PARA CULTIVO IN VITRO (FOPA).....  | 7  |
| 1.8. EXTRATOS NATURAIS POSSÍVEIS DE SEREM USADOS POR POSSUÍREM PEPTÍDEOS BIOATIVOS.....               | 8  |
| 1.8.1. Spirulina maxima .....   | 8  |
| 1.8.2. Kefir .....  | 8  |
| 1.9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....  | 9  |
| 2. EFEITO DOS EXTRATOS DE Spirulina maxima E Kefir NO CULTIVO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIAS DE SUINO..... | 10 |
| 2.1. MATERIAL E METODOS .....   | 11 |
| 2.1.1. Preparação do extrato de Spirulina maxima .....  | 11 |
| 2.1.2. Preparação do extrato de Kefir .....   | 11 |
| 2.1.3. Análise de carboidratos .....  | 12 |
| 2.1.4. Análise de proteínas.....  | 12 |
| 2.1.5. Análise de lipídeos .....  | 12 |
| 2.1.6. HPSEC-MALLS – para dosagem de proteína e carboidratos.....                                     | 13 |
| 2.1.7. SDS-PAGE com corante Coomassie Blue.....   | 13 |
| 2.1.8. Amostra biológica empregados no experimento .....  | 13 |
| 2.1.9. Protocolo experimental.....  | 14 |
| 2.1.10. Histologia clássica.....  | 14 |
| 2.2. ANALISE ESTATÍSTICA .....  | 16 |
| 2.3. RESULTADOS.....  | 17 |
| 2.4. DISCUSSÃO .....  | 22 |
| 3. CONCLUSÃO.....   | 25 |
| 4. REFERÊNCIAS .....  | 26 |

|               |    |
|---------------|----|
| ANEXO 1 ..... | 33 |
| ANEXO 2 ..... | 43 |

## INTRODUÇÃO

99,9% dos folículos pré-antrais serão eliminados durante a vida reprodutiva no recrutamento e desenvolvimento folicular (FIGUEIREDO *et al.*, 2007; FIGUEIREDO *et al.*, 2009; ROCHA, 2013). Devido a essa perda folicular, biotecnias como a manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA) são usadas. Pois a técnica *in vitro* que pode ajudar no resgate da população folicular, pois o interesse centra-se na conservação desses gametas, necessários na biotecnologia de reprodução humana e animal. Porque, muitos são os problemas de infertilidade humana e animal, bem como a necessidade de conservar em animais genótipos valiosos e restaurar a fertilidade nas fêmeas (FIGUEIREDO *et al.*, 2009; ROCHA, 2013).

A técnica MOIFOPA visa incrementar o número de folículos maturados depois de um ciclo reprodutivo sem usar técnicas como: superovulação em animais domésticos e na mulher. Também possibilita estudos *in vitro* de substâncias sob o desenvolvimento de folículos pré-antrais porque pode-se testar diferentes substâncias de interesse médico, isso antes de estudos preliminares com animais.

Este estudo desenvolve-se em dois artigos. O primeiro descreve o desenvolvimento folicular e os meios de cultivo usados *in vitro* para suínos e o segundo artigo apresentará a ação das substâncias *Spirulina maxima* e *Kefir* em cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais de porca pré-púber.

Neste caso o estudo preliminar de *S. maxima* e *Kefir* é importante porque substâncias são atualmente usadas no mercado com propriedades antioxidantes e sem estudos preliminares sobre sua função ou toxicidade na reprodução. Para tanto foram usadas amostras córtex de ovário de fêmeas pré-púbere de suínos segundo metodologia de MAO *et al.*, (2004), em meios de cultivo básico alfa MEM (pH 7.2-7.4) com as dosagens de 10, 50, 100 e 200 µg dos extratos brutos de *S. maxima* e *Kefir* durante um e sete dias de cultura. A avaliação dessas substâncias poderia verificar a segurança no uso destas sobre o cultivo de folículos pré-antrais e assim comprovar o grande interesse na purificação de moléculas ou peptídeos a partir de *S. maxima* e *Kefir*, já que essas possuem diferentes aplicações na medicina.

## 1. EXTRATOS NATURAIS NO DESENVOLVIMENTO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS

Na fisiologia da reprodução da fêmea, os folículos pré-antrais são formados no ovário durante a fase fetal. E ao longo da vida reprodutiva um pequeno número de folículos primordiais será estimulado ao crescimento, pois muitos deles entrara em atresia durante a maturação e desenvolvimento, processos necessários para o sucesso da ovulação (FIGUEIREDO *et al.*, 1999; MAO *et al.*, 2002). O que ocorre é que a maioria dos folículos, (99,9%) não será recrutado para desenvolver-se e sofrerá apoptose (Figueiredo *et al.*, 1999). Nesse contexto, novas metodologias *in vitro* são pesquisadas na tentativa de resgatar esses folículos pre-antrais. Ou seja, é necessário desenvolver meios que impeçam sua morte visando aumentar o número de folículos que irão desenvolver-se e ovular. Em modelos *in vitro* são necessárias inúmeras substâncias para suprir as necessidades básicas para o desenvolvimento desses folículos (FIGUEIREDO *et al.*, 1999). Contudo, é necessário identificar novos componentes capazes de melhorar os resultados já obtidos em biotecnologia da reprodução. Entre eles podem-se citar os extratos naturais que vêm sendo utilizados. Em medicina humana a busca de substâncias alternativas tem ganhado destaque nos últimos anos pois, efeitos secundários de tratamentos, além dos aditivos em alimentos, dietas desbalanceadas, radiações e doenças podem diminuir a fertilidade na mulher. Também na produção de animais domésticos os mesmos fenômenos vêm ocorrendo (SAADI *et al.*, 2015).

Nesse contexto essa revisão bibliográfica tem como objetivo apresentar informações relevantes sobre a fisiologia de formação dos folículos e oócitos nos ovários, bem como seu *cultivo in vitro* tradicional e com novas substâncias alternativas, extratos naturais de interesse médico como *Spirulina maxima* e *Kefir*.

### 1.1. FOLICULOGÊNESE

Em todos os mamíferos o desenvolvimento oocitário inicia na fase fetal, mais especificamente na terceira semana de vida, quando aparecem no ovário às células germinais que produzem gametas haploides e viajam do saco vitelino até as gônadas em formação (células com a metade dos 46 cromossomos). Já que durante a fertilização será necessário que os cromossomos de óvulo e espermatozoide se unam, para formar uma célula diploide, o zigoto (SOTO-SUAZO; ZORN, 2005; ZHAO, 2005; URBINA; LERNER, 2008).

As células germinais ou oogônios entram na primeira meiose para formar o oócito primário que entrará na fase de prófase I e ficará em latência celular ou fase inerte até a puberdade. Na literatura é reportado o inibidor de maturação do oócito que o mantém latente na fase de prófase I. No entanto, na ativação do crescimento folicular os mecanismos ainda não são esclarecidos (SOTO-SUAZO; ZORN, 2005; ZHAO, 2005; URBINA; LERNER, 2008).

No nascimento as fêmeas de mamíferos terão uma carga de dois milhões de oócitos primordiais, passando na puberdade para ordem de 40 a 200 mil e apenas 0,25% deles serão ovulados durante a vida fértil, pois 90% dos folículos entrarão em atresia por apoptose (URBINA; LERNER, 2008; MOORE, 2013).

O desenvolvimento folicular possui uma primeira fase de formação e início de crescimento de folículos primordiais e uma segunda fase de crescimento de folículos primários e secundários. Na primeira fase há transformação de células da granulosa de pavimentosas a cúbicas além de sua proliferação e rápido aumento de tamanho (ARAÚJO, 2014).

## **1.2. FORMAÇÃO E CRESCIMENTO DO FOLÍCULO PRIMORDIAL**

No oócito a primeira fase meiótica ocorre entre 75 e 80 dias na ovelha e entre 91 e 144 dias em bovinos. Os folículos primordiais possuem uma camada simples de células da pré-granulosa que são pavimentosas, sendo a primeira geração de células foliculares. Em suínos o diâmetro folicular é de  $33,8 \pm 3,4\mu\text{m}$  e oócitaro de  $26 \pm 2,5\mu\text{m}$  e na sua ultraestrutura a forma dos folículos é esférica e oval, o citoplasma é homogêneo com pequenas gotas lipídicas ao redor do retículo endoplasmático liso e livres no oolema. Os folículos permanecem quiescentes até a puberdade quando serão estimulados a crescer. Nesta fase os mecanismos de ativação ainda são desconhecidos, mas observa-se incremento de tamanho no folículo e na camada das células da granulosa (SILVA, 2011, ARAÚJO, 2014). Quando os folículos possuem uma camada completa de células da granulosa de forma cúbica, após sua ativação, passam a ser primários com diâmetro folicular de  $40,4 \pm 5,1\mu\text{m}$  e diâmetro oócitaro de  $27,3 \pm 2,8\mu\text{m}$  (SILVA, 2011).

## **1.3. FOLÍCULOS SECUNDÁRIOS**

As células da granulosa crescem e se multiplicam formando uma segunda camada ao redor do oócito e aparece uma capa glicoproteica acelular e amorfa que separa o oócito das células da granulosa, estrutura denominada zona pelúcida, que não se pode observar nos folículos secundários iniciais. A formação de antro se relata em folículos de  $400\mu\text{m}$  de diâmetro (ARAÚJO, 2014). Também

pode aparecer o início da camada das células da teca e a síntese de mRNA no oócito além do início da sensibilidade as gonadotrofinas. Em suínos nesta fase, os folículos possuem um diâmetro folicular de  $84,5 \pm 15,1 \mu\text{m}$  e diâmetro oocitário de  $39,1 \pm 6,8 \mu\text{m}$  (SILVA, 2011). Já em bovinos nesta fase todos os eventos dependem da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator 9 de diferenciação (GDF-9) e estimulação de desenvolvimento folicular *in vitro* que possui suporte para transição do estado primário a secundário (ARAÚJO, 2014).

#### **1.4. FOLÍCULOS TERCEÁRIOS**

Nesta etapa está inclusa o desenvolvimento da camada de células da teca interna e externa, além da formação das células do cúmulus. Neste tipo de folículos em suínos há três grupos de tamanho: menor a 2, entre 2 a 4 e entre 4 a 6mm. O oócito é esférico com núcleo na periferia (SILVA, 2011). Os folículos terciários também são conhecidos como folículos maduros ou de Graaf, ou ainda como pré-ovulatórios.

#### **1.5. DINÂMICA FOLICULAR EM SUÍNOS**

O ciclo estral da fêmea suína é poliestrício não estacional com 21 dias de duração. E sua fase folicular estrogênica ocorre nos dias 14 a 16 do ciclo, quando inicia o crescimento e maturação dos folículos pré-antrais. Esta fase é estimulada pelos hormônios FSH e LH. Após esta fase, se inicia a fase luteínica entre 13 e 16 dias do ciclo, influenciada pela progesterona produzida pelo corpo lúteo (UN, 2015).

O desenvolvimento folicular na fêmea suína, na fase luteínica, dura entre 7 a 15 dias do ciclo estral sem se relatar ondas foliculares, dominância folicular e concentrações plasmáticas de FSH. Já que o corpo lúteo produz inibina e estradiol que regulam negativamente FSH e mantém concentrações baixas durante o recrutamento folicular. Os folículos que irão ovular incrementam seu crescimento nos dias 14 e 16 do ciclo estral e esses são recrutados do *pool* de folículos antrais que se desenvolvem na fase luteínica, pois as fêmeas suínas pré-púberes, púberes e pós desmame possuem um *pool* de 50 folículos de 1 e 6 mm na superfície do ovário. Toda esta fase luteínica é influenciada pela diminuição da concentração de progesterona e aumento dos níveis de LH e FSH. Aqui os folículos menores entram em atresia, por falta de receptores e porque a dominância se dá por tamanho folicular. Na fase folicular (ovulatória) um total de 20 folículos alcançam os 7 a 10 mm (WILLIAMS *et al.*, 2010).

As transições foliculares são influenciadas pelo fator inibidor da leucemia (LIF), o fator de crescimento básico derivado de fibroblastos (bFGF), membros da família do fator transformador do crescimento B (TGFB), fator de diferenciação do crescimento 9 (GDF9), fator morfogênico óssea 15 (BMP15) e fator inibidor de estrutura mülleriana (MIF). GDF9 e BMP15 são produzidos pelo oócito até a ovulação. O MIF é produzido pelas células da granulosa, após o nascimento, que inibe o recrutamento folicular primordial evitando a depleção precoce destes (URBINA; LERNER, 2008). Tem-se incluídos outros reguladores do crescimento como fator de crescimento epidermal (EGF), activina, fator beta transformador do crescimento (TGFB) e retinoblastoma proteína 1 (RB1), (PICTON *et al.*, 2008).

#### **1.6. CULTIVO IN VITRO DE OÓCITOS INCLUSOS NOS FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS (FOPA)**

A biotecnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais, representada pela sigla MOIFOPA, consiste no isolamento ou resgate de folículos pré-antrais a partir de ovários, visando estocagem a curto e longo período por esfriamento (5°) e congelamento (-196°C) respectivamente. Além de promover crescimento e maturação folicular *in vitro* (GIOMETTI, 2003; FIGUEIREDO, *et al.*, 2009; ROCHA, 2013), para isso, é necessário utilizar diferentes substâncias no meio de cultivo em diferentes concentrações em diferentes fases do desenvolvimento folicular (ROCHA, 2013). Além do emprego para o resgate a biotecnica também permite estudos *in vitro* de substâncias como screening de drogas, criando alternativa experimental para o uso de animais de laboratório. Por exemplo, fármacos de interesse médico em estudos preliminares para animais e teste de inocuidade de nano partículas usadas no carreamento de drogas podem se beneficiar destas metodologias (FIGUEIREDO *et al.*, 2009).

Existem diferentes técnicas de cultivo *in vitro* para oócitos inclusos nos folículos pré-antrais (FOPA). O cultivo *in vitro* e cultivo isolado ainda precisam de pesquisas já que os mecanismos de desenvolvimento em cada espécie animal ainda não foram elucidados (GIOMETTI, 2003) e cada espécie animal se comporta de maneira diferentes e possuem necessidades específicas de hormônios, vitaminas e sais minerais.

O cultivo *in vitro* é feito com folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano, já que esse permite manter as características tridimensionais e a perfusão de nutrientes entre os folículos (PICTON *et al.*, 2008; ROCHA, 2013). Também pode ser mantido o contato entre células e as ligações *gap* nos folículos obtendo uma viabilidade por 20 dias (FIGUEIREDO *et al.*, 2009).

No cultivo de folículos isolados são utilizados os folículos primários e secundários por duas metodologias: enzimática e mecânica. Na enzimática se realiza uma dissociação do tecido ovariano e depois uma microdissecção obtendo folículos primários e secundários. Na microdissecção mecânica o estroma é um fator importante, porque em fêmeas (bovinas, ovinas e suínas), esse procedimento é dificultado pela espessura do estroma comparado quando é feito em camundongos (SHUTTLEWORTH *et al.*, 2002). Além disto, se relata o resgate de folículos em suínos de um tamanho de  $2,5 \pm 0,3$ cm, onde se fez uma comparação entre os dois tipos de isolamento. A metodologia enzimática produz maior número de folículos isolados (128), com uma morfologia normal de 74% enquanto à metodologia mecânica isola um menor número folicular (68) com maior percentual de morfologia normal (95%). Entre os folículos morfologicamente normais o diâmetro deles variou entre 233 e 232  $\mu$ m. A integridade e morfologia é mais alta para o processo mecânico (95%) frente ao enzimático (73%). Enquanto a expressão de mRNA de receptores foliculares de hormônios, ligações *gap* e desenvolvimento folicular não foram diferentes entre as duas metodologias (AHN *et al.*, 2012). Após esse isolamento os folículos são colocados em matrizes de colágeno dentro de sistemas bidimensionais e tridimensionais terminando sua maturação (GIOMETTI, 2003).

As duas metodologias podem ser feitas em sequência, podendo-se realizar o cultivo de córtex seguido pelo isolamento de folículos e seu cultivo, para testar após sua fertilização e capacidade meiótica, isso visando à produção de embriões em larga escala.

A espécie suína é importante em estudos de medicina regenerativa já que muitas pesquisas são encaminhadas na produção de materiais xenogênicos, biotecnologia para tecidos e órgãos. Neste caso, o desenvolvimento de oócitos pode contribuir para manter e entender a fertilidade na mulher (AHN *et al.*, 2012). Além disso, os suínos possuem um período curto de gestação e um metabolismo anatômico e características fisiológicas similares aos humanos (BAI, 2013).

A espécie suína possui 210.000 folículos primordiais, seu crescimento e maturação *in vitro* são baixos, perto de 40%, além da competência meiótica e penetração pelo espermatozoide após sua maturação, isto faz necessária a criação de meios de cultivo eficientes (BOULTON, 1997; SHUTTLEWORTH *et al.*, 2002).

Nas espécies de mamíferos é importante que os meios *in vitro* supram os nutrientes, eletrólitos, antioxidantes, aminoácidos, substratos para energia, monossacarídeos, lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas e fatores de crescimento e hormônios para manter a viabilidade além de eliminar os produtos

do metabolismo, como o amoníaco que prejudica o crescimento folicular (GIOMETTI, 2003; PICTON *et al.*, 2008; QUINTINO *et al.*, 2010). Os meios mais usados para desenvolvimento de folículos pré-antrais são o meio essencial mínimo (MEM), Waymouth médium e McCoy's 5a médium junto com antibióticos, antifúngicos e suplementos como transferrina, selênio e insulina (PICTON *et al.*, 2008). Além disto, é importante testar diferentes meios de cultivo já que há diferenças entre eles, por exemplo, entre o meio TCM199 e NCSU23, neste caso o segundo meio foi o melhor para incrementar o número de folículos pré-antrais com formação de antro e para a recuperação do complexo oócito-cumulus (COCs) (METOKI, 2008).

Também é importante usar inibidores da apoptose celular, como fator de crescimento insulínico tipo 1 e 2 (IGF1 e IGF2), fator diferenciador de crescimento 9 (GDF9), 8-bromo AMPc e guanosine monofosfato. Tendo em conta a importância da concentração e o tempo de suplementação dentro do meio de cultivo.

Os extratos energéticos, glucose neste caso, são comuns entre os diferentes tipos de células animais, embora os folículos de humanos e camundongos necessitam de piruvato como fonte principal de energia (PICTON *et al.*, 2008). A glucose é um importante energético em meios de crescimento *in vitro*, enquanto o piruvato é indicado como meio de energia para maturação folicular nas metodologias de folículo isolado.

O uso de soro *in vitro* causa controvérsia, seja homólogo ou heterólogo pode ser transmissor de patógenos como de diferentes vírus (como o da diarreia viral bovina) e, também contém proteínas, aminoácidos, hormônios, carboidratos, componentes da matriz extracelular e fatores de crescimento para adesão celular e proliferação. O soro age como fonte de albumina, equilibra a osmolaridade, diminui radicais livres e age como precursor de esteroides. A substituição deste soro pode ser feita por Soro Albumina Bovina (BSA), já que este incrementa o percentual de morfologia intacta pré-antral em folículos, comparado com o soro, que produz maiores percentuais de extrusão oócitaria e degeneração folicular (PICTON *et al.*, 2008).

Em isolamento de folículos pré-antrais de suínas, os folículos com diâmetros de  $265,8 \pm 8,3 \mu\text{m}$  não tiveram diferenças nas taxas de crescimento, isso quando foram avaliados no cultivo *in vitro* com suplementação de soro de suínas pré-púberes (PGS) e soro fetal (FCS). Mas esses folículos quando combinados com meio de cultivo TCM199 e PGS produziram a maior taxa de resgate de recuperação do complexo oócito-cumulus (COCs). (METOKI, 2008).

O soro fetal bovino (SFB), soros de cabra e ovelha em estro e soro de suíno pré-púbere possuem carboidratos, aminoácidos, fatores de crescimento, hormônios que são fontes de precursores esteroidais que ajudam a inibir a apoptose folicular (QUINTINO *et al.*, 2010).

Um fator limitante em sistemas de resgate de folículos pré-antrais isolados é a escassez destes. A maior parte de tecnologias é encaminhada a maturar esses oócitos *in vitro*, mas o nível de sucesso é variável. Por esta razão e para eliminar a variação na qualidade folicular é importante resgatar e usar folículos primordiais em sistemas *in vitro*, para desenvolver maior número de oócitos de alta qualidade. Para suínos o sistema de matriz de colágeno são ótimos, para folículos isolados entre um diâmetro de 70 a 90  $\mu\text{m}$  é melhor o cultivo deles dentro de gel de colágeno até 110  $\mu\text{m}$  durante 16 dias, após isso o cultivo sobre uma superfície de colágeno é melhor para folículos entre 150 e 200  $\mu\text{m}$ , sendo capazes de entrar na segunda fase de meiose (TELFER, 2000).

### 1.7. HORMÔNIOS NECESSÁRIOS PARA CULTIVO IN VITRO (FOPA)

Além do meio de cultivo base é importante suplementar com diferentes hormônios e fatores de crescimento já que a ativação de folículos primordiais e seu desenvolvimento dependem disto. Relata-se que a suplementação com testosterona em tecido de ovário suíno pré-púbere, durante sete dias, em uma concentração de  $10^{-6}\text{M}$  induz a transição de folículos primordiais a folículos de transição. Além disto, por Western blot e imunohistoquímica foram encontrados receptores androgênicos ativos para testosterona (MAGAMAGE *et al.*, 2011). Também, o suplemento *in vitro* de 100  $\text{ng.mL}^{-1}$  Kit ligand (KL) e testosterona promove o desenvolvimento de folículos primários a secundários. Já que KL não induz especificamente o desenvolvimento folicular, mas incrementa o número de folículos primordiais viáveis e diminui o número de degenerados aos sete dias de cultivo (MAGAMAGE *et al.*, 2011). Isso em meio alfa essential minimum suplementado com 0,08  $\text{mg.mL}^{-1}$  de Kanamicina sulfato, 2,2  $\text{mg.mL}^{-1}$   $\text{NaHCO}_3$ , 50  $\mu\text{M}$  2-mercaptoethanol, 0,1  $\text{mg.mL}^{-1}$  de sodium piruvate, 1% v/v de insulina-transferrina-selenium e 5% v/v de plasma bovino. KL é produzido pelas células da granulosa, presente no oócito e é importante na viabilidade folicular, mas não na ativação de folículos primordiais, isso por um relato em suínas pré-púberes com tecido cultivado *in vitro* e transplantado após um cultivo por um e três dias (MONIRUZZAMAN; MIYANO, 2007).

A suplementação de hormônios como o folículo estimulante (FSH) em concentração de 2  $\text{mLU.mL}^{-1}$  promove a formação de antro e aumento de diâmetro em 83.3% dos folículos avaliados, isso quando comparado com meios de

controles sobre 981 folículos pré-antrais isolados e cultivados, além de diminuir a apoptose de células da granulosa (METOKI, 2008). Além da diminuição de apoptose e formação de antro o soro fetal bovino (SFB) junto EGF (50 ng. mL<sup>-1</sup>) e IGF-1 (100 ng. mL<sup>-1</sup>) incrementa a proliferação das células da granulosa, isso quando o cultivo foi acompanhado com meio Waymouth's, alfa minimum Eagle's essencial médium suplementado com 10 µg. mL<sup>-1</sup> de transferrina, 100 µg. mL<sup>-1</sup> de L-acido ascórbico, 2 mU.mL<sup>-1</sup> de FSH bovina (MAO *et al.*, 2004).

## **1.8. EXTRATOS NATURAIS POSSÍVEIS DE SEREM USADOS POR POSSUÍREM PEPTÍDEOS BIOATIVOS**

### **1.8.1. *Spirulina maxima***

Classificada como cyanobacteria, alga verde-azul, e possui peptídeos bioativos são reconhecidas por seu valor medicinal (KLANCHUI *et al.*, 2012), Elas podem agir como hormônios, neurotransmissores e antibióticos (KORHONEN; PIHLANTO 2006; CARRASCO *et al.*, 2012). Na medicina *S. maxima* é conhecida por seus efeitos antioxidantes porque possui proteínas, ácidos fenólicos, tocoferóis, provitaminas, betacaroteno e ômega 3 e 6. (MIRANDA *et al.*, 1998). Contem ficoproteínas como ficocianina que reduz a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em laboratório e radicais livres (PIÑERO *et al.*, 2001; TORRES; JUÁREZ, 2006).

As ficoproteínas da *S. maxima* tem atividade antioxidante associada com alto poder redutor de radicais livres, sendo proporcional a seu grado de pureza (PIÑERO *et al.*, 2001). Devido a anterior atividade, o interesse no grupo *Spirulina* vem sendo cada vez maior, porque se relata que c-ficocianina associada ao selênio potencializa os efeitos contra o radical superóxido, peróxido de hidrogênio e 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl DPPH (HUANG *et al.*, 2007; MADHYASTHIA; SIVASHANKAI; VATSALA, 2009; GUTIÉRREZ, 2012). Além disso, os produtos fermentados apresentaram ação anti-inflamatória representando assim diferentes aplicações na área de saúde, neste caso no cultivo e maturação de folículos pré-antrais de suíno *in vitro* (GIANG-GONG *et al.*, 2011).

### **1.8.2. Kefir**

Kefir é um produto fermentado de leite de consistência cremosa originado em Balkans, Europa oriental e no Caucasus. A estrutura dos grãos de *kefir* se baseia num consórcio de micro-organismos, complexo formado por leveduras, fungos miceliais, Bactérias ácido lácticas (LAB) e bactérias ácido acéticas (AAB) (REA *et al.*, 1996; FONTÁN *et al.*, 2006; SERAFINI *et al.*, 2014). O *kefir* é

conhecido por suas propriedades imunomoduladoras, anti-inflamatórias e antioxidantes. Todavia, a interpretação de seus resultados é variável, pois ainda não se tem consensos na prática de laboratório (LOPITZ *et al.*, 2006; WEI-SHENG *et al.*, 2009; GONZÁLES-OLIVARES *et al.*, 2011). Os leites fermentados contêm fenóis funcionais que possuem isoflavonoides com poder antioxidante (PATRICK; KALIDAS, 2005). A atividade imune, anti-proliferativa e anti-inflamatória foi comprovada em células cancerígenas (linhagem SGC7901) por provas *in vitro* (ZHINA *et al.*, 2015). Enquanto o poder antioxidante se relaciona com vitamina E (CARVALHO *et al.*, 2011) e o polissacarídeo em concentração dependente (ZHINA *et al.*, 2015).

A função anti-hipertensiva, antitrombótica, opióide, portadora de minerais e também antioxidante tem a ver com peptídeos menores a 14,4 KDa, esses encontrados na fração proteica derivados de casomorfina de alfa e beta caseína (BOSQUE, 2007; GONZÁLES-OLIVARES *et al.*, 2011). *Kefir* também pode estimular a produção de IL-1beta, fator anti-apoptose. Além disto, o polissacarídeo de *kefir* possui ação na cicatrização porque contém glicose, galactose, ramnose, arabinose e manose. Possui poder antioxidante, pois suprime as mudanças morfológicas em células de melanoma humano HMV-1, em fibroblastos TIG-1 e células SK-MEL, porque estas foram expostas a raios ultravioleta (LOPITZ *et al.*, 2006; MOREIRA *et al.*, 2008; WEI-SHENG *et al.*, 2009; GONZÁLES-OLIVARES *et al.*, 2011). O polissacarídeo está associado com um fator de crescimento *kefir* (KGF), que contém beta-interferon, cortisol, noradrenalina que incrementa atividade fagocítica peritoneal e pulmonar (MOREIRA *et al.*, 2008). Com base nessas características surgiu a possibilidade de utilização do *Kefir* como substância suporte para os meios de cultivo *in vitro* de oócitos inclusos em folículos pré-antrais.

### **1.9. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A técnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA) vem sendo usada no resgate e otimização da maturação oocitária, visando encontrar os melhores meios na dinâmica folicular, pois na prática reprodutiva é necessário incrementar o número de folículos pré-antrais maduros. Os extratos naturais podem incrementar as possibilidades de sucesso na biotecnia, preservando a fertilidade da mulher e incrementando a produção em animais domésticos, além da preservação de animais em perigo de extinção.

## 2. EFEITO DOS EXTRATOS DE *Spirulina maxima* E *Kefir* NO CULTIVO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIIS DE SUINO

Em reprodução de mamíferos, 90% dos folículos pré-antrais formam a reserva ovariana e pelo recrutamento folicular 99,9% destes serão eliminados durante a vida reprodutiva (FIGUEIREDO, *et al.*, 2009). Além disto, o microambiente ovariano influencia na qualidade e desenvolvimento dos folículos, interferindo assim na foliculogênese e na fertilidade da fêmea (AMBE, *et al.*, 2005; ANTONIO DE, 2006).

Muitos grupos de cientistas trabalham em busca de substâncias que não sejam citotóxicas aos tecidos ovarianos e desenvolvendo biotecnias que visam resgatar e aproveitar a reserva folicular (AGARWAL, 2004; AMBE, *et al.*, 2005; SILVA, *et al.*, 2008).

A biotecnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA) é amplamente usada para avaliar o efeito de diferentes substâncias e incrementar o número de folículos resgatados, diminuindo a atresia durante o recrutamento folicular (ROCHA, 2013). É necessário estabelecer o melhor meio de cultivo para o desenvolvimento de folículos pré-antrais e para isso são estudadas diferentes substâncias como antioxidantes, hormônios (FSH, LH, estradiol), peptídeos (peptídeo intestinal vasoativo) e fatores de crescimento (activina, GDF-9, KGF), (QUINTINO, *et al.*, 2010).

Além disso, a técnica de MOIFOPA possui diferentes vantagens, pois segundo FIGUEIREDO, *et al.*, (2009), além do estudo reprodutivo essa metodologia poderia ser uma alternativa no uso de animais de laboratório para estudos preliminares de fármacos. Podendo ser empregada antes de testes em animais e humanos e em testes de inocuidade de nano partículas usadas no carregamento de drogas de interesse médico.

Apesar de existir várias pesquisas com diferentes protocolos e substâncias, não há um meio de cultivo definido que seja universal. Nesse contexto, o estudo da utilização de diferentes antioxidantes e matérias protéicas, é indicado para elaborar diferentes protocolos para tais meios de cultivo. Diante das vantagens da biotecnica MOIFOPA, pergunta-se se ela poderia avaliar extratos naturais que podem ser tóxicos ou potenciar o desenvolvimento dos folículos pré-antrais.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a citotoxicidade e o efeito sobre o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais de suínos de extratos de *Spirulina maxima* e *Kefir*. Que são duas substâncias de interesse médico por suas propriedades antioxidantes, antibióticas e imunoestimulantes.

## 2.1. MATERIAL E METODOS

Todos os reagentes químicos e meios de cultivo usados nesta pesquisa foram Sigma Chemical Company® (St. Louis, MO, USA) e usado segundo as indicações do fabricante. Os experimentos foram realizados em LAMOFOPA, Universidade Estadual do Ceará, UECE (Fortaleza-Ceará) e no CENBAPAR, UFPR (Curitiba-Paraná).

### 2.1.1. Preparação do extrato de *Spirulina maxima*

A cepa de *S. maxima* usada foi gentilmente doada pela empresa Ouro-Fino, Ribeirão Preto, São Paulo. A microalga é produzida em tanques *Raceway* de 10.000 m<sup>2</sup> com agitação e temperatura controlada a 30°C em meio *Zarrouk* 50%. Após o processamento e secagem ao sol 10 g foram utilizadas para diluição em 100 mL de água. A cianobactéria foi diluída em 100 mL de água esterilizada e submetida a rompimento celular por 10 minutos em sonificador. O tempo de sonicação necessário ao rompimento foi controlado no microscópio de luz até lise da estrutura em hélice da alga. Após o rompimento a suspensão foi centrifugada a 12.000 xg e seus sedimentos foram descartados. O sobrenadante foi liofilizado e esterilizado com óxido de etileno e mantidos a temperatura ambiente num envelope à vácuo (WON, *et al.*, 2012). Na reidratação da alga, um dia antes de seu uso, foram preparadas suspensões com quatro diferentes concentrações (10, 50, 100 e 200  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) e estocadas a – 20°C.

### 2.1.2. Preparação do extrato de *Kefir*

O extrato de *Kefir* foi preparado segundo o protocolo de MACHADO, (2014). Foram fermentados grãos de *kefir*, por 48 h a 30°C em Erlenmeyer com 300 mL de soro de leite, ao qual foram adicionados 30% (m/v) de glicose, 2% (m/v) de peptona, 4% (m/v) de fosfato e 4% (m/v) de citrato. Depois os grãos de *kefir* foram separados do meio líquido por centrifugação a 80.000 g, onde o sobrenadante foi recuperado. Em seguida, precipitou-se o produto fermentado com etanol absoluto por 24 h a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado centrifugado a 80.000 g e lavado com água destilada. A seguir foi realizada diálise por 48 h e liofilização da solução. O pó de extrato de *kefir* liofilizado foi esterilizado com óxido de etileno e colocado num envelope e acondicionado à vácuo até seu uso. Um dia antes de seu uso, foram preparadas suspensões com quatro diferentes concentrações (10, 50, 100 e 200  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) e estocadas a – 20°C.

### 2.1.3. Análise de carboidratos

O conteúdo de carboidratos foi avaliado pela metodologia de Dubois, *et al.*, (1956). Os extratos de *kefir* e *Spirulina maxima* foram avaliados em concentração de 1000  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  de água destilada. O teste foi desenvolvido em triplicata para todas as amostras.

### 2.1.4. Análise de proteínas

A concentração de proteínas nas amostras foi avaliada pelo método de Lowry e de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich F9552) em três repetições da amostra e com triplicata de cada dosagem. Numa solução de extrato bruto de 500  $\mu\text{g}$  de *kefir* e, em separado, de *Spirulina maxima*, diluindo-os em 1 mL de água destilada. A absorbância da suspensão foi medida em 750 nm junto com uma curva padrão de Soro Albumina Bovina (BSA) (GARY, 1979). Após leitura dos valores dos padrões foram plotados e comparados com as absorbâncias dos extratos. A seguir foram convertidos os valores em percentual para determinar o conteúdo de proteína nos extratos brutos.

### 2.1.5. Análise de lipídeos

A metodologia usada para dosagem de lipídeos foi a de Bligh e Dyer, (1959) com modificações. Este método tem por base a homogeneização do extrato seco, com metanol e clorofórmio, em proporções iguais para formar uma única fase miscível com a água e daí separar os lipídeos. Para isso é necessário misturar 20 mL Metanol com 20000  $\mu\text{g}$  do extrato de *kefir* ou *S. máxima*, após colocar 10 mL de Clorofórmio, 10 mL Sulfato de sódio e 8 mL de água.

Como os lipídeos ficam na fase de clorofórmio é necessário colocar as amostras em estufa a 70°C *overnight*. Após a secagem os tubos foram pesados e o percentual de lipídeos foi determinado pela seguinte equação:

$$x = \frac{\frac{\text{vol total cloroformio}}{\text{aliquota}} \times \text{masa lipídeos}}{\text{masa amostra}} \times 100$$

### 2.1.6. HPSEC-MALLS – para dosagem de proteína e carboidratos

O método utilizado foi a cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser multiângulos e de índice de refração (HPSEC-MALLS/RI/UV). Para conhecer a pureza das proteínas e de carboidratos, uma amostra de cada extrato de *S. maxima* ou de *Kefir*, ( $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) foi solubilizada em solução de  $\text{NaNO}_2$  (0,1 M) contendo 200 ppm de  $\text{NaN}_3$ . Esta amostra foi filtrada com membranas de acetato de celulose ( $0,2 \mu\text{m}$ ). A análise foi efetuada em um cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC), equipado com um detector de índice de refração diferencial WATERS modelo 2410 (RI) e detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS) WYATT TECHNOLOGY modelo DAWN DSP com 18 canais, acoplados em série. Foram utilizadas quatro colunas de gel permeação WATERS em série, com limites de exclusão de 7.106, 4.105, 8.104 e 5.103  $\text{g.Mol}^{-1}$ . O eluente utilizado foi solução de  $\text{NaNO}_2$  0,1 M contendo  $\text{NaN}_3$  200 ppm, com fluxo de  $0,6 \text{ mL.min}^{-1}$ , monitorado através de bomba peristáltica WATERS 515 (RAMOS PAREDES, 2009).

### 2.1.7. SDS-PAGE com corante *Coomassie Blue*

A metodologia foi segundo o protocolo do laboratório de Biologia Molecular do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia (PPGEBB) da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Os valores de proteína de cada extrato (*S. maxima* e *Kefir*) determinados pela metodologia descrita por Lowry (1951) e  $15 \mu\text{L}$  foram usados na eletroforese de gel de poliacrilamida para determinar a massa das proteínas dentro de cada extrato e comparando com um padrão PMM (*Broad Range Protein*, V849A e tamanho  $500 \mu\text{L}$  -100 lanes). A concentração do gel de eletroforese foi 12%, e a corrida eletroforética foi realizada com voltagem de 30 mA. A corrida foi interrompida quando o marcador (de azul de bromofenol) chegou à parte inferior do gel.

### 2.1.8. Amostra biológica empregados no experimento

Amostras de ovário de porcas pré-púberes foram coletadas em Frigorífico de São José dos Pinhais, Paraná, Brasil, o qual segue as normas do Sistema Federal de Inspeção (SIF).

Foram retirados ovários completos de dez fêmeas suínas (*Sus scrofa domestica*), pré-púberes, de raça Yorkshire (n-20 ovários). Após a coleta os ovários foram dissecados para limpeza e eliminação de fragmentos de gordura,

ligamentos e peritônio. Em seguida, os ovários foram lavados com álcool 70% e duas vezes com meio *Minimum Essential Medium* (MEM) contendo 100 µg/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e foram transportados ao laboratório a 37°C (Mao, *et al.*, 2004). De cada par de ovários foram obtidos 11 fragmentos para compor os três tratamentos (grupo controle, grupo tratado com extrato de *Kefir* e grupo *S. maxima*) do cultivo de 1 e 7 dias.

### 2.1.9. Protocolo experimental

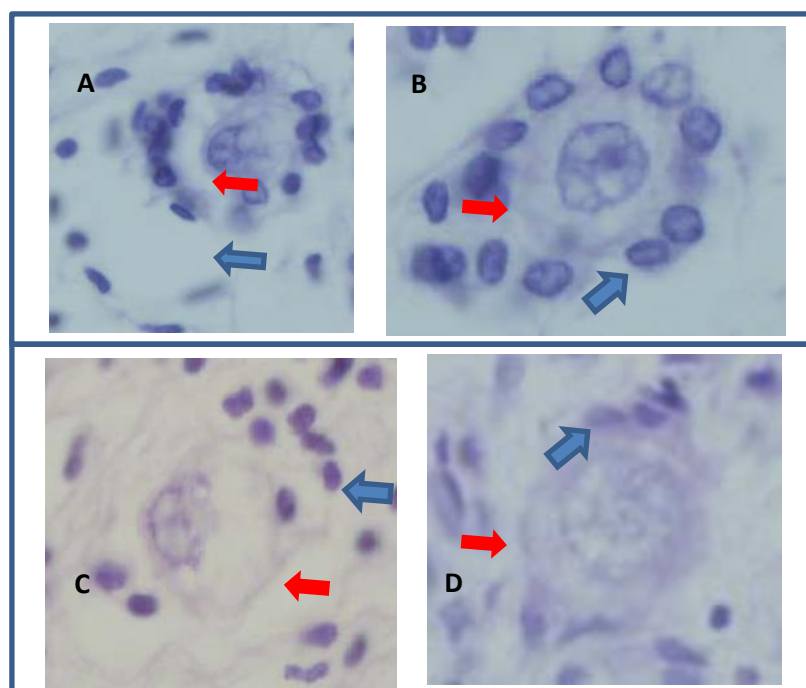
O cultivo *in situ* de tecido de córtex de ovário seguiu a metodologia proposta por Mao, *et al.*, (2004). O meio de cultivo base usado foi alfa MEM (pH 7,2-7,4), 100 µg/mL de ácido ascórbico, 1000 µg/1 mL de BSA, 29.200 µg/mL de hipoxantina, 10 µg/mL de transferrina, 1 mM de piruvato, 100 µg/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Vinte e dois fragmentos de 5 mm x 5 mm e 1 mm de espessura foram dissecados do par de ovários (segundo protocolos do laboratório - LAMOFOPA da UECE), obtendo assim, uma amostra por poço para cada teste nos dias 0, 1 e 7. Cada fragmento foi cultivado em placa de 24 poços com 1 mL de meio de cultivo e 10 µL dos extratos liofilizado de *kefir* e aquoso de *S. maxima*. Foram testadas quatro concentrações (10, 50, 100 e 200 µg. mL<sup>-1</sup>) de cada extrato. No grupo controle foi utilizado meio sem adição dos extratos.

### 2.1.10. Histologia clássica

Após o cultivo todas as amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% em PBS, solução com pH 7,2 a 7,4, por 12 h a 4°C. Em seguida foram processadas em banhos de álcool com concentrações crescentes de 70 a 100% e em parafina. Os cortes foram feitos com 7 µm de espessura e corados com ácido periódico Schiff-PAS, hematoxilina e cobertos com lamínula e cola DPX. Cada corte foi avaliado usando um microscópio ótico (Nikon, Tokyo, Japão) em aumento de 400x. Na leitura foram considerados os folículos vivos, com base na integridade de oócito e células da granulosa, presença ou ausência de corpos picnóticos, retração ooplásmica e organização das células da camada granulosa. Na figura 1, são mostradas as estruturas avaliadas para classificação dos folículos como pré-antral degenerado (esquerda) e com morfologia normal (direita) submetidos ao cultivo com extratos, já que a leitura poderia variar entre substâncias. Um folículo atresico mostra as células da granulosa desajeitadas (flecha azul, esquerda), oócito com retração e presença de picnose (flecha vermelha, esquerda), enquanto um folículo com morfologia normal mostra integridade nas células da granulosa (flecha azul, direita) e oócito (flecha vermelha, direita). Além disso, os folículos foram classificados em primordial,

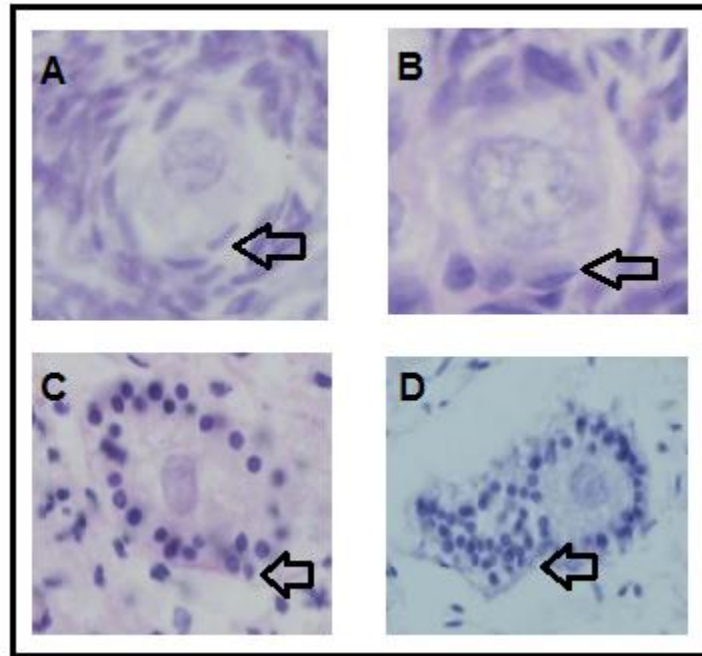
intermediário, primário e secundário (HULSHOF, *et al.*, 1994; MAGALHÃES, *et al.*, 2012). Para maiores detalhes ver figura 2.

Figura 1. Diferenças entre folículos pré-antrais morfologicamente normais e degenerados após adição dos extratos *Spirulina maxima* e Kefir no cultivo, 2015.



**A,B-** Suplementação de extrato de *Kefir* em cultivo de folículos pré-antrais: folículo degenerado (A) vs folículo com morfologia normal (B). **C,D-** Adição de extrato de *Spirulina maxima* em cultivo *in vitro*: folículo em processo de atresia (C) vs folículo com morfologia normal (D). Flecha azul: desorganização (esquerda) vs integridade de células da granulosa (direita), Flecha vermelha: integridade oocitário vs retração de oócito (de esquerda a direita).

Figura 2. Classificação dos diferentes folículos pré-antrais segundo HULSHOF et al., 1994 observados em lâminas histológicas de tecido ovariano de suíno, 2015.



A - *Folículos Primordiais* - possuem uma camada de células pavimentosas da granulosa (flecha); B - *Folículos Intermediários* - possuem uma camada de células pavimentosas e cuboidais da granulosa (flecha); C - *Folículos Primários* - possuem uma camada de células cuboidais (flecha); D - *Folículos Secundários* - possuem duas camadas de células cuboidais na granulosa (flecha).

## 2.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram submetidos com o programa R Commander para os testes de normalidade e homogeneidade das amostras usando Shapiro-Wilk e teste de Bartlett, respectivamente. Os percentuais de folículos primordiais e em desenvolvimento e sobrevivência folicular, além dos diâmetros oocitário e foliculares foram submetidos à análise de variância (ANOVA), usando teste de Tukey para comparação entre grupos, nas concentrações por período de cultivado comparado ao controle dos dias 0, 1 e 7 (baseado segundo a metodologia de MAGALHÃES, *et al.*, 2012).

### 2.3. RESULTADOS

Na tabela 1 são dados os valores determinados de carboidratos, lipídeos e proteínas para extrato de *Spirulina maxima*, que foram respectivamente de 6,03; 9,70 e 48,85%. Para *Kefir* foram 1,66% de carboidratos, 9,45% de lipídeos e 30,87% de proteínas solúveis.

Quando usado a metodologia de HPSEC-MALLS, no ultravioleta e índice de refração, os dois extratos apresentaram maior quantidade de proteínas, coincidindo com a análise de SDS-PAGE. Neste caso, o extrato de *S. maxima* mostrou bandas protéicas definidas de massa de 50 kDa, e outras variando de 25 a 15 kDa. Enquanto o extrato de *Kefir* evidenciou bandas protéicas de massa molecular entre 10 a 15 kDa, 15 a 25 kDa, 30 a 35 kDa e 50 a 60 kDa.

Tabela 1- Percentual médio  $\pm$  desvio padrão da concentração de carboidratos, lipídeos e proteínas solúveis de extrato de *Spirulina maxima* e *Kefir*.

|                    | Concentração (%)        |                  |
|--------------------|-------------------------|------------------|
|                    | <i>Spirulina maxima</i> | <i>Kefir</i>     |
| Proteínas solúveis | 48,85 $\pm$ 0,21        | 30,87 $\pm$ 0,88 |
| Carboidratos       | 06,03 $\pm$ 0,57        | 01,66 $\pm$ 0,14 |
| Lipídeos           | 09,70 $\pm$ 3,08        | 09,45 $\pm$ 0,39 |

No cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, para cada extrato natural foi lido um total de 1650 folículos pré-antrais em 275 lâminas histológicas usando a técnica de MOIFOPA. Verificou-se que a população diminuiu no primeiro dia e ainda mais no dia sete. Esta característica se repete nos cultivos de todas as espécies animais, já que é o tempo máximo de cultivo folicular *in vitro* (GIOMETTI, 2003).

Na Tabela 2, verifica-se que a sobrevivência folicular, variou de 48,67 $\pm$ 5,06 a 62 $\pm$ 8,37% para o extrato de *S. maxima* e de 50 $\pm$ 7,82 a 52,50 $\pm$ 6,3% para o extrato de *Kefir* no dia um de cultivo (D1). No dia sete de cultivo (D7) a sobrevivência esteve entre 6,67 $\pm$ 7,82 a 34,67 $\pm$ 5,06% nas concentrações usadas para extrato aquoso *S. maxima* e para o extrato liofilizado de *Kefir* entre 20,0 $\pm$ 3,33 e 36,67 $\pm$ 6,67%. Na análise estatística não se verificou diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre as diferentes concentrações já que a resposta foi semelhante ao controle negativo tanto para *S. maxima* quanto para *Kefir*. Além disso, foi evidenciada uma alta variabilidade individual quando utilizada maiores concentrações de extrato de *S. maxima*.

Tabela 2- Percentual de sobrevivência de folículos pré-antrais de suínos nos dias zero a sete com diferentes concentrações de extratos de *Spirulina maxima* e *Kefir* e grupos controle.

| Dias de cultivo | Concentração ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) | Percentual de sobrevivência <i>S. maxima</i> (%) | Percentual de sobrevivência <i>Kefir</i> (%) |
|-----------------|--|--|--|
| DIA 0           | 0                                      | 84.66 $\pm$ 01.82 <sup>aB</sup>                  | 73,33 $\pm$ 06.67 <sup>aB</sup>              |
| DIA 1           | controle                               | 63,33 $\pm$ 08,50 <sup>aB</sup>                  | 65,83 $\pm$ 07,39 <sup>aB</sup>              |
|                 | 10                                     | 62,00 $\pm$ 08,37 <sup>aB</sup>                  | 52,50 $\pm$ 06,31 <sup>aB</sup>              |
|                 | 50                                     | 58.33 $\pm$ 08,39 <sup>aB</sup>                  | 52,00 $\pm$ 08,37 <sup>aB</sup>              |
|                 | 100                                    | 48.66 $\pm$ 05,06 <sup>aB</sup>                  | 50,66 $\pm$ 07,60 <sup>aB</sup>              |
|                 | 200                                    | 53.33 $\pm$ 07,70 <sup>aB</sup>                  | 50,00 $\pm$ 07,82 <sup>aB</sup>              |
| DIA 7           | controle                               | 43.33 $\pm$ 09,03 <sup>aA</sup>                  | 46,70 $\pm$ 04,71 <sup>aA</sup>              |
|                 | 10                                     | 34.66 $\pm$ 05,06 <sup>aA</sup>                  | 36,66 $\pm$ 06,67 <sup>aA</sup>              |
|                 | 50                                     | 33.33 $\pm$ 07,45 <sup>aA</sup>                  | 29.16 $\pm$ 10,67 <sup>aA</sup>              |
|                 | 100                                    | 29.33 $\pm$ 04,35 <sup>aA</sup>                  | 34.66 $\pm$ 08,03 <sup>aA</sup>              |
|                 | 200                                    | 06.66 $\pm$ 07,82 <sup>aA</sup>                  | 20,00 $\pm$ 03,33 <sup>aA</sup>              |

Letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si em relação a concentrações de extratos e letras maiúsculas diferentes na coluna indicam diferenças estatísticas significativas entre os dias de cultivo ( $P < 0,05$ ).

Na Figura 3, os dados percentuais de folículos primordiais estão sendo analisados em conjunto já que estes parâmetros são ligados à ativação e evolução folicular. Ou seja, enquanto há menor número de folículos primordiais deve ocorrer maior quantidade de folículos em desenvolvimento. Todas as concentrações de *S. maxima* e *Kefir* promoveram uma ativação e desenvolvimento folicular adequado, não havendo diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ).

No primeiro dia de cultivo, para *S. maxima* os diâmetros foliculares estiveram entre 30,8 $\pm$ 06,9 com 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do extrato e 36,3 $\pm$ 08,7 com 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do extrato. Para os extratos de *Kefir* ficaram entre 25,5 $\pm$ 2,5 com 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 35,9 $\pm$ 4,8 com 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Tabela 3). O diâmetro oócitaro, em cultivo com *S. maxima* ficou entre 17,8  $\pm$  1,8 com 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e de 19,4 $\pm$ 2,5 com 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Para *Kefir* diâmetro oócitaro ficou entre 17,7 $\pm$ 1,5 com 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e de 20,5 $\pm$ 3,2 com 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Tabela 4).

No sétimo dia de cultivo para *S. maxima* o diâmetro folicular ficou entre 18,2 $\pm$ 8,1 com 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e de 36,3 $\pm$ 9,9 com 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . O diâmetro oócitaro

ficou entre  $12,3 \pm 5,5$  com  $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$  a  $19,7 \pm 4,3$  com  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Para extrato liofilizado de *Kefir* o diâmetro folicular variou entre  $34,09 \pm 8,4$  com  $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $42,1 \pm 5,0$  com  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . O diâmetro oócitaro ficou entre  $18,6 \pm 3,0$  com  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $21,5 \pm 0,9$  com  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

As concentrações de extratos de *S. maxima* e *Kefir* testadas estimularam o crescimento folicular e oócitaro de forma similar ao controle já que não houve significância estatística ( $p > 0,05$ ).

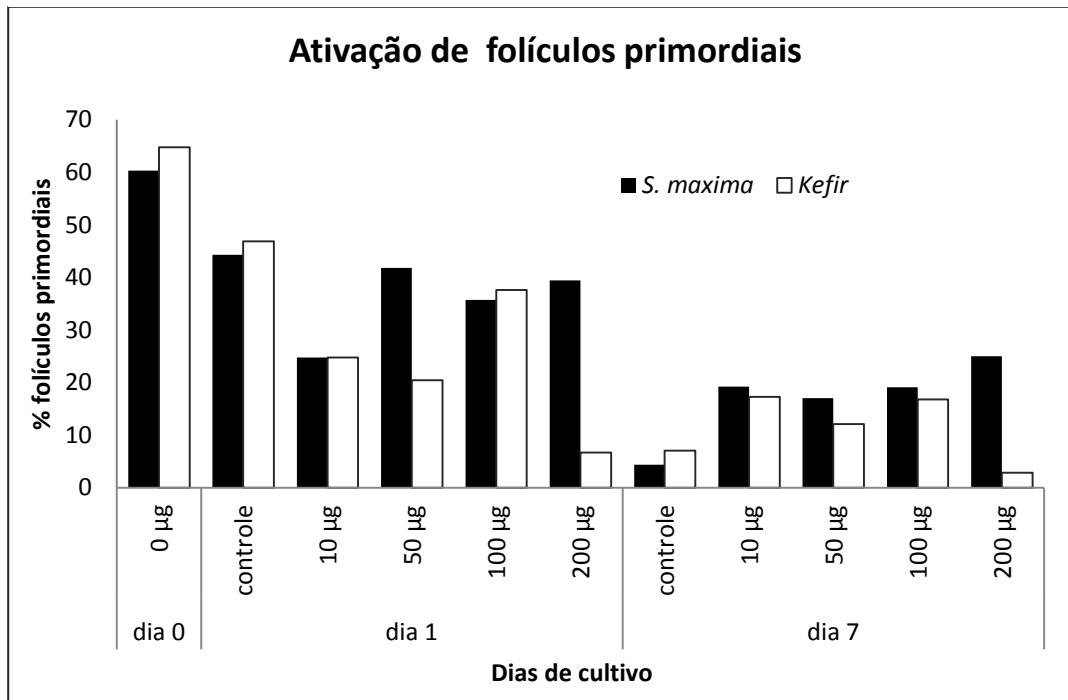
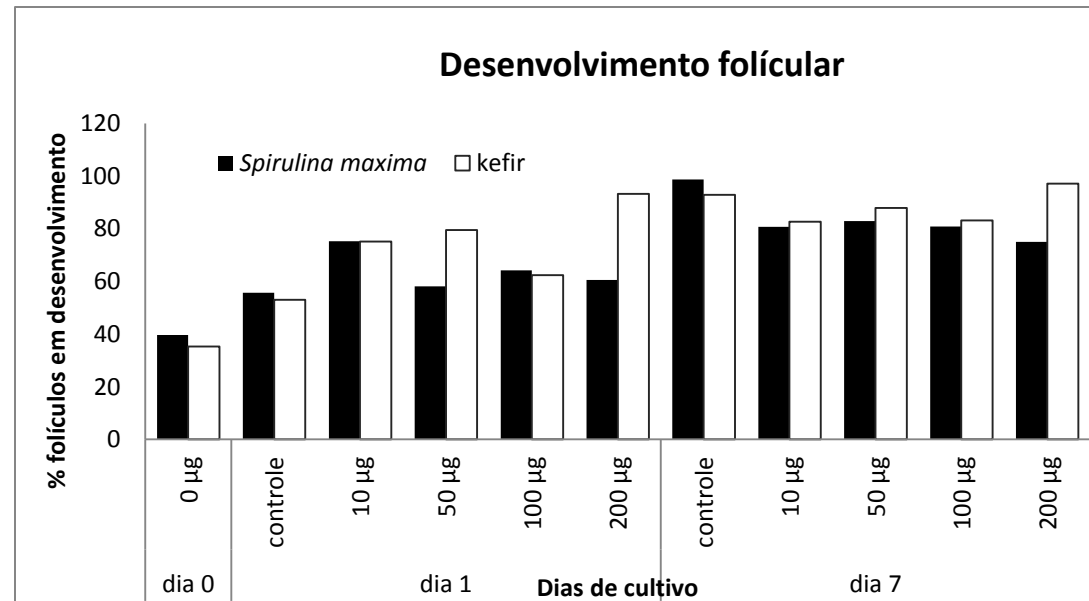


Figura 3- A, Percentuais de desenvolvimento de folículos primordiais de porcas nos dias zero a sete com diferentes concentrações de extrato de *Spirulina maxima* e Kefir. B, Percentuais de folículos pré antrais suínos em desenvolvimento nos dias zero a sete com diferentes concentrações de extratos de *Spirulina maxima* e Kefir.



**Tabela 3-** Percentual de diâmetros dos folículos pré-antrais suínos após cultivo *in vitro* de 1 e 7 dias com diferentes concentrações ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de *Spirulina maxima*, *Kefir* e grupo controle.

| Dias de cultivo | Concentrações ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) | Percentual diâmetro folicular S. maxima (%) | Percentual diâmetro folicular Kefir (%) |
|-----------------|--|---|---|
| dia 0           | 0  | 39,80 $\pm$ 06,80 <sup>aA</sup>             | 28,94 $\pm$ 05,40 <sup>aA</sup>         |
| dia 1           | controle   | 33,22 $\pm$ 08,10 <sup>aA</sup>             | 32,81 $\pm$ 04,20 <sup>aA</sup>         |
|                 | 10   | 30,80 $\pm$ 06,90 <sup>aA</sup>             | 25,52 $\pm$ 02,50 <sup>aA</sup>         |
|                 | 50   | 36,27 $\pm$ 08,70 <sup>aA</sup>             | 35,14 $\pm$ 07,40 <sup>aA</sup>         |
|                 | 100  | 32,96 $\pm$ 08,90 <sup>aA</sup>             | 30,33 $\pm$ 05,40 <sup>aA</sup>         |
|                 | 200  | 31,81 $\pm$ 04,40 <sup>aA</sup>             | 35,85 $\pm$ 04,80 <sup>aA</sup>         |
| dia 7           | controle   | 40,53 $\pm$ 07,30 <sup>aA</sup>             | 38,05 $\pm$ 08,30 <sup>aA</sup>         |
|                 | 10   | 28,75 $\pm$ 07,20 <sup>aA</sup>             | 36,66 $\pm$ 07,60 <sup>aA</sup>         |
|                 | 50   | 30,41 $\pm$ 08,00 <sup>aA</sup>             | 42,12 $\pm$ 05,00 <sup>aA</sup>         |
|                 | 100  | 36,33 $\pm$ 09,90 <sup>aA</sup>             | 34,31 $\pm$ 07,40 <sup>aA</sup>         |
|                 | 200  | 18,22 $\pm$ 08,10 <sup>aA</sup>             | 34,09 $\pm$ 08,40 <sup>aA</sup>         |

Letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si em relação a concentrações de extratos e letras maiúsculas diferentes na coluna indicam diferenças estatísticas significativas entre os dias de cultivo ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 4-** Percentual de diâmetros dos oócitos pré-antrais suínos após cultivo *in vitro* de 1 e 7 dias com diferentes concentrações ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de *Spirulina maxima* e *Kefir*, e grupo controle.

| Dias de cultivo | Concentrações ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) | Percentual de diâmetro oócitos S. maxima (%) | Percentual de diâmetro oócitos Kefir (%) |
|-----------------|--|--|--|
| dia 0           | controle   | 24,19 $\pm$ 03,00 <sup>aA</sup>              | 22,29 $\pm$ 03,30 <sup>aA</sup>          |
| dia 1           | controle   | 20,40 $\pm$ 03,50 <sup>aA</sup>              | 20,38 $\pm$ 01,90 <sup>aA</sup>          |
|                 | 10   | 19,38 $\pm$ 02,50 <sup>aA</sup>              | 17,66 $\pm$ 01,50 <sup>aA</sup>          |
|                 | 50   | 17,75 $\pm$ 01,80 <sup>aA</sup>              | 20,50 $\pm$ 03,20 <sup>aA</sup>          |
|                 | 100  | 19,20 $\pm$ 02,30 <sup>aA</sup>              | 18,40 $\pm$ 02,70 <sup>aA</sup>          |
|                 | 200  | 19,12 $\pm$ 02,60 <sup>aA</sup>              | 19,98 $\pm$ 01,10 <sup>aA</sup>          |
| dia 7           | controle   | 22,01 $\pm$ 02,90 <sup>aA</sup>              | 22,06 $\pm$ 02,30 <sup>aA</sup>          |
|                 | 10   | 17,86 $\pm$ 04,70 <sup>aA</sup>              | 20,91 $\pm$ 02,60 <sup>aA</sup>          |
|                 | 50   | 18,41 $\pm$ 03,10 <sup>aA</sup>              | 21,45 $\pm$ 00,90 <sup>aA</sup>          |
|                 | 100  | 19,66 $\pm$ 04,30 <sup>aA</sup>              | 18,60 $\pm$ 03,00 <sup>aA</sup>          |
|                 | 200  | 12,33 $\pm$ 05,50 <sup>aA</sup>              | 19,60 $\pm$ 03,20 <sup>aA</sup>          |

Letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si em relação a concentrações de extratos e letras maiúsculas diferentes na coluna indicam diferenças estatísticas significativas entre os dias de cultivo ( $P < 0,05$ ).

## 2.4. DISCUSSÃO

Neste estudo, o extrato aquoso de *S. maxima* apresentou valor de lipídeos constante nas triplicatas (9,70) e a concentração protéica foi de 48,85. Segundo dados da literatura, *S. maxima* possui concentração de lipídeos entre 6,38 a 11%, de proteína é variável de 60 a 77% com base em peso seco (CHAMORRO, *et al.*, 1997; RAMADAN; ASKER; IBRAHIM, 2008; GEFFROY e SIMON, 2013). As proteínas de *S. maxima* são conhecidas por conterem aminoácidos essenciais como isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina e valina (MENDIOLA, *et al.*, 2007; RAMADAN, *et al.*, 2008; AMBROSI, *et al.*, 2008). Também, são relatados dois peptídeos com função anti-inflamatória denominados Lдавnr e MMLDF (THANH-SANG, *et al.*, 2013).

Os extratos de *Kefir* apresentaram peptídeos menores de 1,4 a 14,4 kDa similar aos dados de literatura. Interessante observar que peptídeos com massas variando de 1,4 a 14,4 kDa possuem propriedades bioativas antitrombóticas, anti-hipertensivas, imunomoduladoras e anti-inflamatórias (HONG, *et al.*, 2009; BOSQUE, 2007; GONZÁLES, *et al.*, 2011).

Na avaliação por SDS-PAGE as proteínas mostraram várias massas moleculares, e provavelmente se estivéssemos trabalhando com frações purificadas seria possível amplificar o potencial de atividade de sobrevivência e desenvolvimento dos folículos. Por exemplo, uma das proteínas de *S. maxima*, a ficocianina, é um flavonóide com atividade antioxidante maior que o ácido ascórbico usado em cultivos *in vitro*, com massa molecular de 38,5, 116 e 247kDa (PIÑERO, *et al.*, 2001; HUANG, *et al.*, 2007; MADHYASTHA, *et al.*, 2009). No extrato aquoso aqui avaliado as proteínas apresentaram massa de 50 e 25 a 15 kDa. Para *Kefir* as proteínas observadas no presente trabalho correspondem às descritas na literatura, peptídeos funcionais menores de 14,4 kDa, com função antioxidante e anti-inflamatória (BOSQUE, 2007; HONG, *et al.*, 2009; GONZÁLES, *et al.*, 2011).

Na sobrevivência de folículos pré-antrais os dois extratos, *S. maxima* e *Kefir* não apresentaram citotoxicidade já que estatisticamente as diferentes concentrações agiram de forma similar ao controle ( $P > 0,05$ ), demonstrando sua impossibilidade de provocar a morte dos folículos cultivados *in vitro*. Apesar dos valores encontrados para *S. maxima* no dia 7, não se pode afirmar que houve toxicidade da substância, pois seria necessário utilizar testes mais específicos

como de viabilidade oócitaria e testes de apoptose celular para confirmar ou infirmar a atividade. Em peixes zebra alimentados com *S. platensis* se relata que o número de ovos por desova em fêmeas diminuiu e a qualidade incrementou quando comparado com os peixes que não tiveram a suplementação na dieta. Pode-se atribuir que *S. platensis* poderia influir na seleção e dominância dos oócitos (GEFFROY e SIMON, 2013). Também são os relatos de estudo *in vitro* sobre citotoxicidade em *S. máxima*. Por exemplo, três trabalhos recentes não relatam efeitos negativos em camundongos, ratos e ratos Wistar machos diabéticos onde extratos de *S. maxima* foram administrados em diferentes dosagens sem encontrar alterações morfológicas nos eritrócitos, tecido hepático, cérebro, rim e baço, além de obter uma progênie saudável em camundongos (CHAMORRO, *et al.*, 1997; SALAZAR, *et al.*, 1998; WON, *et al.*, 2012). Entre os testes complementares de citotoxicidade há o teste de *Chopper*, o cultivo de folículo isolado, eletroforese para avaliar fragmentação de DNA, imunohistoquímica e *TUNEL*. Testes que avaliam marcadores celulares de apoptose e integridade do folículo ovariano (SANTOS, *et al.*, 2005; MATOS, *et al.*, 2007) e que poderiam também serem usados. Também os resultados de *S. maxima* mostraram alta variabilidade individual entre as amostras. Sabe-se da alta variabilidade individual na produção de oócitos *in vitro* e *in vivo* em resposta aos tratamentos de superovulação, já que sempre há uma variação individual (OLIVEIRA, *et al.*, 2010). Por exemplo, em gado Nelore, o número óvulos e embriões variam significativamente ao tratamento com hormônios, também em vacas Holstein tiveram diferente número de folículos para coleta após o tratamento de superovulação (BARUSELLI, *et al.*, 2006). Neste caso o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais visa resgatar o máximo de folículos igual que os tratamentos de superovulação, por isso a variabilidade entre fêmeas é alta já que o ciclo estral é diferente em cada animal (BARUSELLI, *et al.*, 2006; OLIVEIRA, *et al.*, 2010).

Para o extrato de *Kefir* foram encontrados estudos apenas avaliando a toxicidade subcrônica. Em camundongos a toxicidade foi avaliada após administração por via oral. Avaliou-se a toxicidade em tecido hepático, rim, ovário, testículos, ceco, íleo e glândula suprarrenal, hemograma e enzimas hepáticas. Em todas as avaliações não se verificou alterações patológicas (OWAGA, *et al.*, 2014; DINIZ, *et al.*, 2014). No presente estudo realizou-se um teste preliminar, porém, seria necessário realizar mais testes específicos de toxicidade de cada extrato e incrementar o número de animais no estudo para que haja repetibilidade na avaliação citotóxica de novas substâncias obtidas por bioprocessos.

O diâmetro oócitario é importante, porque a maturação oocitária inadequada inviabiliza a fecundação e aumenta a ocorrência de polispermia e bloqueio do desenvolvimento embrionário (XU e GREVE, 1988; GOTTARDI e

MINGOTI, 2009). Segundo SILVA, (2011) o diâmetro de folículos primordiais suínos é de  $33,8 \pm 3,4$  e em primários é de  $40,4 \pm 5,1$   $\mu\text{m}$ . O diâmetro oócitaro é de  $26,00 \pm 2,5$  e  $27,3 \pm 2,8$   $\mu\text{m}$  respectivamente, mostrando alto desenvolvimento das células da granulosa e pouco crescimento do oócito entre as fases foliculares. Comparado com os resultados descritos nesse estudo, *Kefir* apresentou resultados superiores ao de *S. maxima* já que manteve melhor, durante os sete dias de cultivo, o diâmetro folicular (max:  $42,10 \pm 5,00$  e min:  $34,10 \pm 8,40$ ) e oócitaro (max:  $21,50 \pm 0,90$  e min:  $18,60 \pm 3,00$ ). Enquanto que *S. maxima* manteve o diâmetro oócitaro com pouco desenvolvimento das células da granulosa (diâmetro folicular: max. de  $36,30 \pm 8,00$  e min. de  $18,20$  e diâmetro oócitaro: max. de  $19,70$  e min. de  $12,30$ ). O fenômeno foi similar na ativação folicular e desenvolvimento folicular já que *Kefir* foi superior a *S. maxima*, pois teve melhor ativação e maior desenvolvimento.

Embora, nenhuma das substâncias tenha apresentado toxicidade folicular agindo de forma similar ao controle ( $P > 0,05$ ), o modelo testado poderia ser avaliado suprimindo o efeito do ácido ascórbico que poderia ter ocultado os efeitos anti-apoptótico de *S. maxima* e *Kefir*. Particularidades da espécie estudada (suínos), também poderia ter influenciado nos resultados obtidos. Pois antioxidantes como, por exemplo, a vitamina E (alfa-tocoferol), não possui ação no desenvolvimento de folículos pré-antrais, uma vez que a vitamina E não é essencial para essa espécie animal (SILVA, *et al.*, 2011). Assim o efeito dos extratos poderia ter sido menor. Outras espécies animais deverão ser estudadas uma vez que a vitamina E tem influência em espécies como bovinos, ovinos e caprinos.

Para que haja homogeneidade na aplicação da biotécnica MOIFOPA em biotecnologia e esta possa ser utilizada de forma eficiente na análise de fármacos, e extratos naturais é importante controlar todos os elementos que constituem o meio de cultivo. Também é importante utilizar um elevado número de amostras para diminuir o efeito individual e realizar a técnica em laboratórios de referência que já tenham estrutura ideal e equipe treinada para execução dos protocolos. Por se tratar de uma tecnologia relativamente nova, não há muitos trabalhos na literatura e com isso é necessário realizar estudos preliminares, que possibilitam conhecer e fixar futuros protocolos de pesquisa. Ainda seria interessante purificar as moléculas e isoladamente testá-las para determinar qual delas possui ação no desenvolvimento de folículos pré-antrais. Estas substâncias possuem baixo custo no mercado e sua alta disponibilidade, se torna uma alternativa viável para substituir os meios comerciais utilizados na produção *in vitro* de oócitos.

### 3. CONCLUSÃO

Os extratos de *Spirulina maxima* e *Kefir* não possuem citotoxicidade na sobrevivência, ativação, desenvolvimentos e diâmetro folicular de suínos, pois não houve diferença ( $P>0,05$ ) nos resultados entre os extratos e o grupo controle. De forma geral, qualitativamente o extrato de *Kefir* apresentou melhor ativação e desenvolvimento folicular em folículos pré-antrais de suínos comparado ao extrato de *S. maxima*.

#### 4. REFERÊNCIAS

- AHN, J. I. *et al.* *In vitro*-growth and gene expression of porcine preantral follicles retrieved by different protocols. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**. Volume 25, número 7, p. 950-955, 2012.
- AMBE A. K., *et al.* Las concentraciones intrafoliculares de esteroides sexuales y su correlación con las enzimas antioxidantes en la calidad de los ovocitos en un programa de fertilización *in vitro*. **Ginecología y Obstetricia de México**. Medigraphic Artemisa en línea, número 73, p. 19-27, 2005/janeiro. Disponível em: <<http://www.medigraphic.com/pdfs/ginobs/mex/gom-2005/gom051d.pdf>>. Acesso em: 02/01/2015.
- AMBROSI M. A; REINEHR C.O; BERTOLIN T. E; COSTA J. A. V; COLLA L. M. Propriedades de saúde de *Spirulina* spp. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. volume. 29, número2, p.109-117. 2008.
- AGARWAL A; ALLAMANENI SS. Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. **Reproductive BioMedicine Online**. Cleveland USA, volume 9, número 3, p. 338-347, 2004/ 16 jul. Disponível em: <[www.rbmonline.com/Article/1427](http://www.rbmonline.com/Article/1427)>. Acesso em: 25/12/2014.
- ANTONIO DE E. D. **Efecto de la administración de antioxidantes orales en las adaptaciones al ejercicio físico**. 250 f. Tesis doctoral (departamento de fisiología) – Facultad de farmacia, Universitat de València, Valencia, España, 2006.
- ARAÚJO V. *In vitro* culture of bovine preantral follicles: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**. Volume 12, número 1, 2014.
- BAI Y. Location and characterization of female germline stem cells (FGSCs) in juvenile porcine ovary. **Cell Proliferation**. Volume 46, número 5, p. 516, 2013.
- BARUSELLI P. S., *et al.* Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**. Volume 65, numero 1, p 77-88. 2006.
- BLIGH E. G; DYER W. J. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**. 37. 911-917. 1959. Visto em 14 de outubro de 2014 em <http://www.tabaslab.com/protocols/BlighDyer.pdf>.
- BOSQUE A. DE. **Leches fermentadas con actividad anti-hipertensiva: identificación de péptidos y evaluación de su biodisponibilidad**. 201 f. Dissertação, Universidad autónoma de Madrid, Depto de química-física aplicada, Madrid, Espanha, 2007. Disponível em: <[http://digital.csic.es/bitstream/10261/4671/1/Quiros\\_Tesis.pdf](http://digital.csic.es/bitstream/10261/4671/1/Quiros_Tesis.pdf)> Acesso em: 22 de janeiro de 2015.
- CHAMORRO G., *et al.*, Reproductive and peri-and postnatal evaluation of *Spirulina maxima* in mice. **Journal of Applied Phycology**. Número 9, p. 107-112. 1997.

- BOULTON M. I. Advances in swine in biomedical research. **Experimental Physiology**. Volume 82, número 4, p. 803-804, 1996.
- CARRASCO J. et al. Use of Proteomics and Peptidomics Methods in Food Bioactive Peptide Science and Engineering. **Food Engineering Reviews**. Volume 4, número 4, p. 224–243. 2012.
- CARVALHO F. *et al.* Atividade antioxidante do *kefir* em diferentes meios de cultura. **Congresso Nacional da SBAN**, Fortaleza, Brasil, 20-23 de junho 2011, Nutrire, Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, Brasil. Número 36, p. 190-190, Junho 2011. Resumo.
- DINIZ R. D., *et al.*, Evaluation of the subchronic toxicity of kefir by oral administration in Wistar rats. **Nutrición Hospitalaria**, volume 29, número 6, p.1352-1359. 2014.
- DUBOIS M., *et al.*, Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**. Volume 28. Numero 3. 350-356. 1956.
- FIGUEIREDO J. R. Desenvolvimento e aplicações do ovário artificial em caprinos. **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, número 18, 2009. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/60644/1/AAC-Desenvolvimento-e-aplicacoes.pdf>. Acesso em: 27 de janeiro de 2015.
- FIGUEIREDO J. R. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, volume 32, número 2, p. 143-152, abr/jun 2007. Disponível em: <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/143.pdf>. Acesso em: 6 de janeiro de 2015.
- MAGAMAGE M. *et al.* Testosterone induces activation of porcine primordial follicles *in vitro*. **Reproductive Medicine and Biology**. Volume 10, número 1, p. 21-30, 2011.
- MAGAMAGE M. *et al.* Effect of KIT Ligand on the viability of porcine primordial follicles *in vitro*. **Journal of Mammalian Ova Research**. Volume 28, número 1, p. 61-67, 2011.
- MAO J. *et al.* Effect of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on porcine preantral follicular growth, antrum formation, and stimulation of granulosa cell proliferation and suppression of apoptosis *in vitro*. **Journal of Animal Science**. Volume 82, número 7, p. 1967-1975. 2004.
- METOKI, T. effects of follicular fluids on the growth of porcine preantral follicle and oocyte. **Zygote**. Volume 16, número 3, p. 239-247, 2008.

- MIRANDA M. S. *et al.* Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. Volume 31, número 8, p. 1075-1079, 1998.
- MOORE K. **Embriologia Clínica**. Nona Edição: Elsevier, 2013.
- MONIRUZZAMAN M; MIYANO T. KIT-KIT Ligand in the growth of porcine oocytes in primordial follicles. **Journal of Reproduction and Development**. Volume 53, número 6, p. 1273-1281, 2007.
- MOREIRA M. *et al.* Atividade anti-inflamatória de carboidrato produzido por fermentação aquosa de grãos de *Kefir*. **Química Nova**, São Paulo, Brasil. Volume 31, número 7, 2008. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422008000700027&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422008000700027&script=sci_arttext). Acesso em: 25 de janeiro de 2015.
- FONTÁN M.C; MARTÍNEZ S; FRANCO I; CARBALLO J. Microbiological and chemical changes during the manufacture of *Kefir* made from cows' milk, using a commercial starter culture. **International Dairy Journal**. Volume 16, 762–767. 2006.
- GARY L. P. Review of the Folin Phenol Protein Quantitation method of Lowry, Rosebrought, Farr and Randall. **Analytical Biochemistry**. Número 100, p. 201-220. 1979.
- GEFFROY B. e SIMON O. Effects of *Spirulina platensis* based diet on zebrafish female reproductive performance and larval survival rate. **Cybium**. Número 37, p. 1-2. 2013.
- GIANG-GONG L. *et al.* Antioxidant effects and UVB protective activity of *Spirulina (Arthrospira platensis)* products fermented with lactic acid bacteria. **Process Biochemistry**. Volume 46, número 7, p. 1405-1410, 2011.
- GIOMETTI I. C. **Cultivo de folículos pré-antrais**. Monografia, Faculdade de pós-graduação de medicina veterinária – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003. Disponível em: <<http://www.geocities.ws/andbt/semi03/lnes.pdf>>. Acesso em: 3 de janeiro de 2015.
- GONZÁLES O. L.G., *et al.* Liberación de peptidos bioactivos por bacterias lácticas en leches fermentadas comerciales. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, México, volume 10, número 2. Disponível em: <[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1665-27382011000200004&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1665-27382011000200004&script=sci_arttext)>, Acesso em: 20 de janeiro de 2015.
- GOTTARDI F.P e MINGOTI G.Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, volume 33, numero 2, p 82-94. 2009.

- GUTIÉRREZ R. Efecto de *Spirulina (Arthrospira) maxima* sobre el estrés oxidativo inducido por adjuvante de Freund completo em rata. **Revista Latino-Americana de Química**, México, 39 (suplemento especial), p. 312, 2012.  
Disponível em: <  
[http://www.researchgate.net/publication/256082357\\_EFECTO\\_DE\\_SPIRULINA\\_\(ARTHROSPIRA\)\\_MAXIMA\\_SOBRE\\_EL\\_ESTRES\\_OXIDATIVO\\_INDUCIDO\\_POR\\_ADYUVANTE\\_DE\\_FREUND\\_COMPLETO\\_EN\\_RATA](http://www.researchgate.net/publication/256082357_EFECTO_DE_SPIRULINA_(ARTHROSPIRA)_MAXIMA_SOBRE_EL_ESTRES_OXIDATIVO_INDUCIDO_POR_ADYUVANTE_DE_FREUND_COMPLETO_EN_RATA)>. Acesso em: 10/01/2015.
- HUANG B. J. *et al.* Characterization and antioxidant activity of selenium-containing phycocyanin isolated from *Spirulina platensis*. **Food Chemistry**. Volume 100, número 3, p. 1137-1146, 2007.
- HONG WEI-SHENG. *Et al.* Effects of kefir supernatant and lactic acid bacteria isolated from kefir grain on cytokine production by macrophage. **International Dairy Journal**. Número 19, p. 244-251, 2009.
- HULSHOF S.C.J.; FIGUEIREDO J.R.; BECKERS J.B. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Quarterly Journal of Veterinary Science**, volume 16, p.78-80, 1994.
- HUANG Z., *et al.* Characterization and antioxidant activity of selenium-containing phycocyanin isolated from *Spirulina platensis*. **Food Chemistry**. China, número 100, p. 1137-1146, 2007.
- KLANCHUI A. *et al.* Systems biology and metabolic engineering of *Arthrospira* cell factories. **Computational and Structural Biotechnology Journal**. Número 3, p.12, 2012.
- KORHONEN H; PIHLANTO A. Bioactive peptides: Production and functionality. **International Dairy Journal**. Volume 16, número 9, p.945–960, 2006.
- LOPITZ F. *et al.* Kefir a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. **Revista Iberoamericana de Micología**. Volume 23, número 2, p. 67-74, 2006.
- MACHADO M. R. **Produção de composto bioativo a base de polissacarídeo e proteína com atividades angiogênica e antiinflamatória utilizando cultura mista de bactérias e leveduras do kefir tibetano em soro de leite**. Dissertação (Doutorado em engenharia de bioprocessos e biotecnologia) – Setor de ciências tecnológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.
- MADHYASTHA H. K. *et al.* C-phycocyanin from *Spirulina fusiformis* exposed to blue light demonstrated higher efficacy of *in vitro* antioxidant activity. **Biochemical Engineering Journal**, Japão. Número 43, 2008.

- MAGALHÃES *et al.* Effect of sequential medium on *in vitro* culture of goat ovarian cortical tissue. **Animal Reproduction Science**. Número 132, p.159-168. 2012.
- MAO J. *et al.* Effect of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on porcine preantral follicular growth, antrum formation, and stimulation of granulosa cell proliferation and suppression of apoptosis *in vitro*. **Journal of Animal Science**. Volume 82, p. 1967-1975. 2004.
- MATOS T. M. DE *et al.* Técnicas para avaliação da qualidade de folículos ovarianos pré-antrais cultivados *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, volume 31, numero 4, p. 433-442. 2007.
- MENDIOLA J. A. *et al.*, Screening of functional compounds in supercritical fluid extracts from *Spirulina platensis*. **Food Chemistry**. Número 102, p. 1357-1367. 2007.
- OLIVEIRA A.C.S. *et al.* Técnicas de sincronização para superovulação de doadoras *Bos Taurus* e *Bos Indicus*. **Quarto Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**. 23, 24,25 de setembro. Londrina PR. p. 186-197. 2010.
- OWAGA, M.J. *et al.* Oral toxicity evaluation of kefir-isolatéd *Lactobacillus kefiranofaciens* M1 in Sprague–Dawley rats. **Food and Chemical Toxicology**. Número 70, p. 157-162. 2014.
- PATRICK Mc; KALIDAS S. Phenolic antioxidant mobilization during yogurt production from soymilk using *Kefir* cultures. **Process Biochemistry**. Volume 40, número 5, p. 1791-1797, 2005.
- PICTON H. M. *et al.* The *in vitro* growth and maturation of follicles. **Reproduction: The Journal of the Society for Reproduction and Fertility**. Volume 136, número 6, p. 703-715. 2008.
- PIÑERO J.E; BERMEJO P.; VILLER, Antioxidant activity of diferent fractions of *Spirulina platensis* protean extract. **IL Farmaco**, Espanha, número 56, p. 497-500, 2001.
- QUINTINO G, *et al.* Suplementação proteica no meio de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais. **Acta Scientiae Veterinariae**, volume 38, número 4, p. 341-349, 2010.  
Disponível em: <http://www.ufrgs.br/actavet/38-4/PUB%20922.pdf>. Acesso em: 27 de janeiro de 2015.
- RAMADAN M. F.; ASKER M. M. S; IBRAHIM Z. K. Functional bioactive compounds and biological activities of *Spirulina platensis* lipids. **Czech Academy of Agricultural Sciences Food**. Número 26, p. 211–222. 2008.
- RAMOS P. L. **Extração e caracterização dos polissacarídeos das raízes de *Lepidium meyenii* e teste de atividade inseticida**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências-Bioquímica. 2009.

- REA M.C. *et al.* *kefir-like grains: their structure, microbial composition and fermentation kinetics.* **Journal of Applied Bacteriology.** Volume 81, número 1, p. 83–94, 1996.
- ROCHA F. L. **Estrategias para maximização ou preservação do potencial reprodutivo de fêmeas: das células-tronco germinativas aos folículos pré-antrais.** 222 f. Dissertação (doutorado em ciencias veterinarias)-Ciencias veterinarias, Universidade estadual do Ceará, Fortaleza, 2013. Disponível em: [http://www.uece.br/ppgc/dmdocuments/LucianaFaustino\\_Tese.pdf](http://www.uece.br/ppgc/dmdocuments/LucianaFaustino_Tese.pdf). Acesso em: 20 de janeiro de 2015.
- SAADI S. *et al.* Recent advances in food biopeptides: Production, biological functionalities and therapeutic applications. **Biotechnology Advances.** Volume 33, número 1, p.80–116, 2015.
- SALAZAR M. *et al.* Subchronic toxicity study in mice fed *Spirulina maxima*. **Journal of Ethnopharmacology.** 62. 235-241. 1998.
- SANTOS R. R. *et al.* Teste de toxicidade e criopreservação de folículos pré-antrais ovinos isolados utilizando glicerol, etilenoglicol, dimetilsulfóxido e propanodiol. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.** São Paulo, volume 43, numero 2. p 250-255. 2006.
- SERAFINI F. *et al.* *Kefir fermented milk and kefir promote growth of Bifidobacterium bifidum PRL2010 and modulate its gene expression.* **International Journal of Food Microbiology.** Volume 178, número 16, p. 50-59, 2014.
- SILVA A. **Estudo do processo biotecnológico de produção, extração e recuperação do pigmento ficocianina da *Spirulina platensis*.** 87 f, Dissertação, (programa de pós-graduação em processos biotecnológicos, área de concentração agroindústria, Departamento de engenharia química, setor de engenharia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008. Disponível em: <http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/19583/DissertacaoFinalIII.pdf?sequence=1>. Acesso em: 29 de janeiro de 2015.
- SILVA G.M. *et al.* Papel dos antioxidantes no cultivo *in vitro* de células ovarianas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal,** Belo Horizonte, volume 35, número 3, p. 315-326, 2011/jul-set. Disponivelem: <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v35n3/pag315-326.pdf>. Acesso em: 28/12/2014.
- SILVA R. *et al.* Ultrastructural characterization of porcine oocytes and adjacent follicular cells during follicle development: lipid component evolution. **Theriogenology,** volume 76, número 9, p. 1647-1657. 2011.

- SHUTTLEWORTH G. *et al.* In vitro development of pig preantral follicles cultured in a serum free medium and the effect of angiotensin II. **Reproduction: The Journal of the Society for Reproduction and Fertility**. Volume 123, número 6, p. 807-818, 2002.
- TELFER E E. In vitro development of oocytes from porcine and bovine primary follicles. **Molecular and Cellular Endocrinology**. Volume 163, número 1, p. 117-123. 2000.
- THAN-SANG VO; BOMI and KIM; SE-KWON. Purification of novel anti-inflammatory peptides from enzymatic hydrolysate of the edible microalga *Spirulina maxima*. **Journal of Functional Foods**. Número 5, p. 1336-1346. 2013.
- WON H. N. *et al.* Effect of *Spirulina maxima* on spermatogenesis and steroidogenesis in streptozotocin-induced type 1 diabetic male rats. **Food Chemistry**. Volume 134, número 1, p. 173-179. 2012.
- TORRES D; JUÁREZ O. Comportamiento antioxidante y caracterización de un extracto polar de *Spirulina maxima*. **Segundo Congreso Internacional de Química Médica**, 2, 2006, México. Presentaciones orales, México: UNAM. Disponible em: [file:///C:/Users/Carolina/Downloads/99\\_torres-duran\\_y\\_juarez-oropeza.%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Carolina/Downloads/99_torres-duran_y_juarez-oropeza.%20(1).pdf). Acceso em: 7 de janeiro de 2014.
- UN. UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. 2015. Anatomía y fisiología de la reproducción animal. Bogotá. **Facultad de Medicina Veterinaria**. Resumen. Disponible em: [http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/veterinaria/2017107/und\\_2/html/fase\\_1\\_uteal.html](http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/veterinaria/2017107/und_2/html/fase_1_uteal.html). Acceso em: 26 de maio de 2015.
- URBINA M; LERNER J. **Fertilidad y Reproducción Asistida**. Primeira edição. Venezuela: Médica Panamericana C.A, 2008.
- WEI-SHENG H. *et al.* Effects of kefir supernatant and lactic acid bacteria isolated from kefir grain on cytokine production by macrophage. **International Dairy Journal**. Volume 10, número 4, p. 244-251, 2009.
- WILLIAMS, S. I. *et al.* Follicular dynamics and time of ovulation in gilts and postweaning sows. **InVet**, Volume 12, número 1, p. 33, 2010.
- XU K.P. e GREVE T. A detailed analysis of early events during in-vitro fertilization of bovine follicular oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, volume 82, p.127-134, 1988.
- ZHINA C. *et al.* Chemical and physical characteristics and antioxidant activities of the exopolysaccharide produced by Tibetan kefir grains during milk fermentation. **International Dairy Journal**. Número 43, p. 15-21, 2015.

## ANEXO 1

### A. PROCESSO DE COLETA DAS AMOSTRAS

1. Foram tomados o par de ovários de 5 fêmeas suínas após o sacrifício para o teste de cada substância.



Foram tres grupos de cinco animais por cada substância, para *S. maxima*, *Ganoderma lucidum* e *Kefir*.

Adaptado de: <http://www.epmrq.gov.ec/index.php/servicios/faenamiento/faenamiento-porcinos>

2. Dos ovários foram removidas a túnica, ligamentos e gorduras para fazer uma lavagem segundo o procedimento definido por LAMOFOPA:

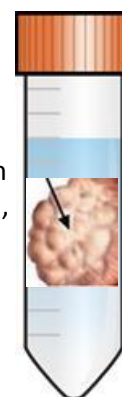


A. Uma primeira lavagem com álcool 70% por dez segundos.



B. Duas lavagens com  $100\mu\text{g. mL}^{-1}$  de penicilina,  $100\mu\text{g. mL}^{-1}$  de estreptomicina por dez segundos

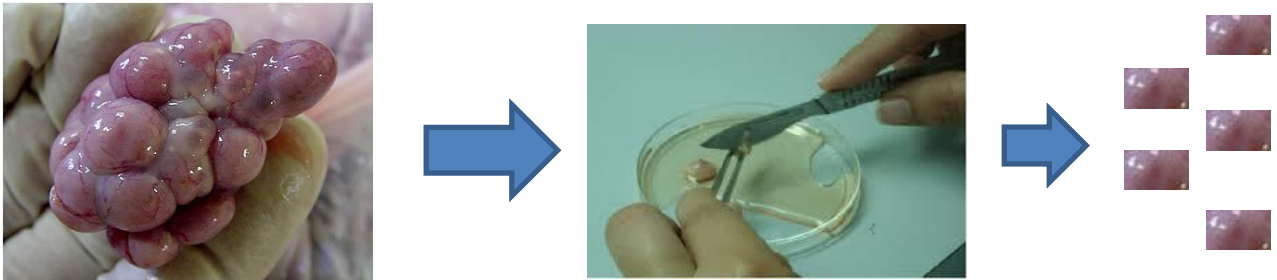
C. Cada par de ovários foi transportado em tubos falcon de 15 mL com solução de MEM, 10mL, a  $4^{\circ}\text{C}$  até por quatro horas.



Adaptado de: <http://www.clker.com/clipart-10573.html>

## B. FRAGMENTAÇÃO DAS AMOSTRAS NO LABORATORIO.

No laboratório, sob condições estéreis, os ovários foram fragmentados em 12 partes de um tamanho de 5x5mm e 1mm de espessura do córtex ovariano, as amostras foram submetidas a protocolo padronizado previamente no LAMOFOPA:



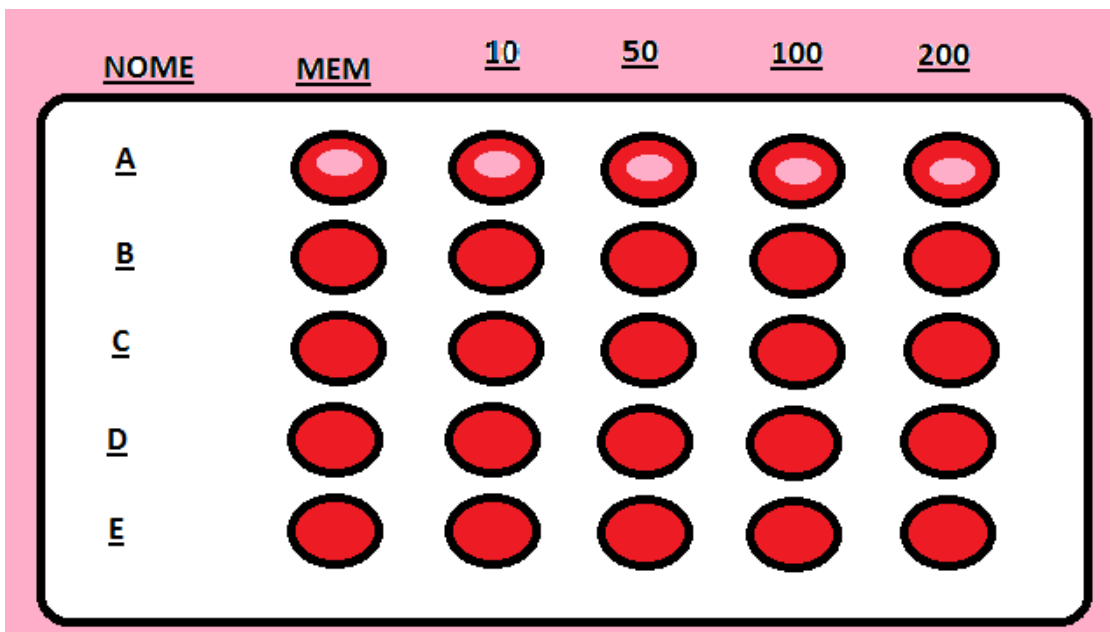
Adaptado de [https://www.3tre3.it/foto-settimana/11-Apr-2012\\_15/abstracts/6/](https://www.3tre3.it/foto-settimana/11-Apr-2012_15/abstracts/6/) e <http://lamofopa.com.br/>

- A- Dois fragmentos a fresco foram usados para, controle no dia zero de cultivo para cada animal.
- B- Cinco fragmentos foram usados para fazer a histologia no dia um.
- C- Cinco fragmentos foram usados para histologia no dia sete do experimento
- D- O processo foi repetido para cada substância, *S. maxima*, *Ganoderma lucidum* e *Kefir*.

## C. CULTIVO DE CÓRTEX DE OVÁRIO

Cada amostra de córtex de ovário foi colocada num pozo em placa de cultivo. Foram cinco animais, A. foi tomada uma amostra e colocada num pozo controle (médio sem substância), B. pozo de médio com 10 µg de substância, C. pozo de médio com 50 µg de substância, D. pozo de médio com 100 µg de substância e E. pozo de médio com 200 µg de substância. Todo o processo foi feito por substância.

- ✓ Grupo 1. *Spirulina maxima* (5 animais).
- ✓ Grupo 2. *Kefir* (5 animais).
- ✓ Grupo 3. *Ganoderma lucidum* (5 animais).



\* Placa de cultivo desenhada por cada substância, foi usada uma placa para o dia um, e mais uma para o dia sete.

O cultivo *in situ* de tecido de córtex de ovário realizado segundo metodologia de Mao *et al.*,(2004). O meio de cultivo básico continha meio alfa MEM (pH 7.2-7.4),  $100\mu\text{g. mL}^{-1}$  de ácido ascórbico,  $1\text{ mg. mL}^{-1}$  de BSA,  $0,0292\text{g. mL}^{-1}$  de hipoxantina,  $10\mu\text{g. mL}^{-1}$  de transferrina,  $1\text{ mM}$  de piruvato,  $100\mu\text{g. mL}^{-1}$  de penicilina e  $100\mu\text{g. mL}^{-1}$  de estreptomicina.

Os fragmentos foram colocados em disco de cultivo de 24 poços com 1mL de alfa MEM+ mais  $10\mu\text{L}$  das diferentes concentrações das três substâncias. Os cultivos foram mantidos a  $39^{\circ}\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$  no ar e os meios de cultivo foram trocados a cada dois dias junto com as substâncias.

#### **D. PROCESSO DE HISTOLOGIA**

Foi tomado o tecido no dia um de cultivo e no dia sete de cultivo, além do fragmento em fresco no dia zero de cultivo. Antes da histologia as amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% em PBS, solução com pH 7,2 a 7,4, por 12 h a  $4^{\circ}\text{C}$ , todos os procedimentos foram seguindo os protocolos do laboratório LAMOFOPA, Universidade Estadual do Ceará, ver anexo 1.

##### **Paraformaldeído a 4% em PBS**

Água destilada ou Milli-Q 1000 mL

Paraformaldeído 40 g

**Preparo:**

- + Dissolver o paraformaldeído em PBS aquecido sob agitação
- + Acrescentar gotas de NaOH a 40% para a solução ficar transparente
- + Após esfriar, ajustar o pH para ficar em torno de 7,2 a 7,4

Depois foram colocadas em banhos de álcool com concentrações crescentes para ser mergulhadas em parafina:

- a- Solução de álcool 75% por uma hora
- b- Solução de álcool 80% por uma hora
- c- Solução de álcool 95% por uma hora
- d- Álcool absoluto I por uma hora
- e- Álcool absoluto II por uma hora
- f- Álcool absoluto III por uma hora
- g- Xilol I por uma hora
- h- Xilol II por uma hora
- i- Xilol III por uma hora
- j- Parafina I por uma hora
- k- Parafina II por uma hora
- l- Parafina III por uma hora

Deixaram-se esfriar os blocos e foram feitos cortes de 7 $\mu$ m para corar com ácido periódico Schiff-PAS, hematoxilina:

- 1- Incubar a 37°C as amostras para derreter a parafina
- 2- Xilol I por quinze minutos
- 3- Xilol II por quinze minutos
- 4- Álcool absoluto I, dez segundos.
- 5- Álcool absoluto II, dez segundos.
- 6- Álcool absoluto III, dez segundos.
- 7- Álcool absoluto 90%, dez segundos.
- 8- Álcool absoluto 80%, dez segundos.

- 9- Álcool absoluto 70%, dez segundos.
- 10- Lavar com água da torneira, duas vezes.
- 11- Ácido periódico por dez a quinze minutos
- 12- Lavar com água da torneira, duas vezes
- 13- Reativo de Schiff, 13 minutos
- 14- Solução sulfurada, 2 minutos.
- 15- Lavar com água da torneira por cinco minutos
- 16- Hematoxilina por 45 segundos
- 17- Lavar com água da torneira por cinco minutos
- 18- Álcool absoluto 70%, dez segundos
- 19- Álcool absoluto 80%, dez segundos
- 20- Álcool absoluto 90%, dez segundos
- 21- Álcool absoluto I, dez segundos.
- 22- Álcool absoluto II, dez segundos.
- 23- Álcool absoluto III, dez segundos.
- 24- Xilol I, um minuto.
- 25- Xilol II, um minuto.
- 26- Xilol III, um minuto.
- 27- Cobrir com lamínulas com cola DPX.

Ácido periódico, preparo de solução de:

- + Água destilada 980 mL
- + Ácido periódico 20 g

No preparo misturar reagentes e guardar em frasco âmbar na geladeira.

#### **Reativo de Schiff,**

- + Fucsina básica 1g, dissolver em água fervente
- + Água destilada 200mL
- + HCL 1N 20mL, dissolver em água a 60°C
- + Metabissulfito de Na 1g, dissolver em água a 25°C

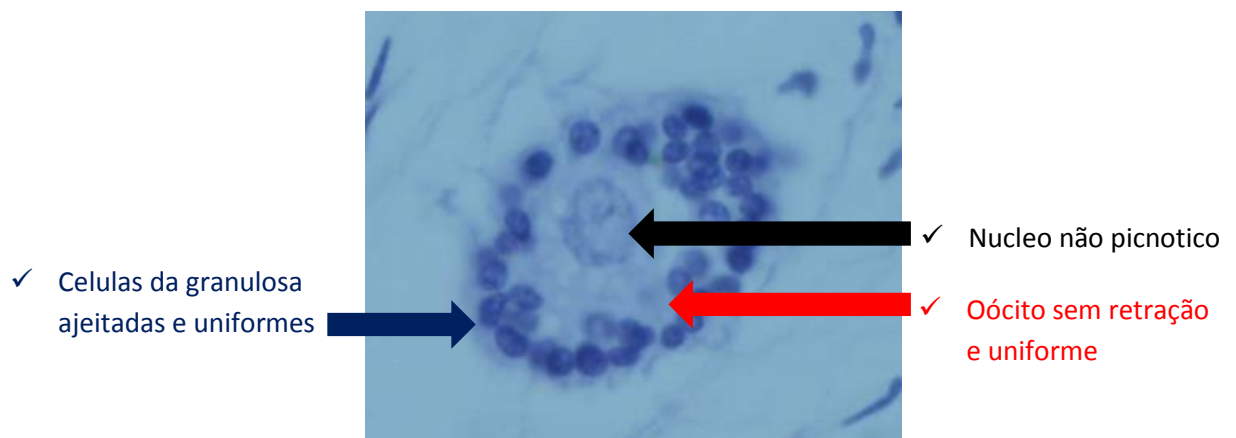
+ Carvão ativado 1g

Para o preparo ferver 200mL de água destilada e dissolver a fucsina básica, acrescentar o HCL quando a temperatura atingir 60°C, acrescentar o metabissulfito após a solução ficar em 25°C, agitar y guardar em frasco âmbar por 24 horas e após o tempo acrescentar o carvão ativado e agitar, por ultimo filtrar até a solução ficar cor púrpura e armazenar a 4°C.

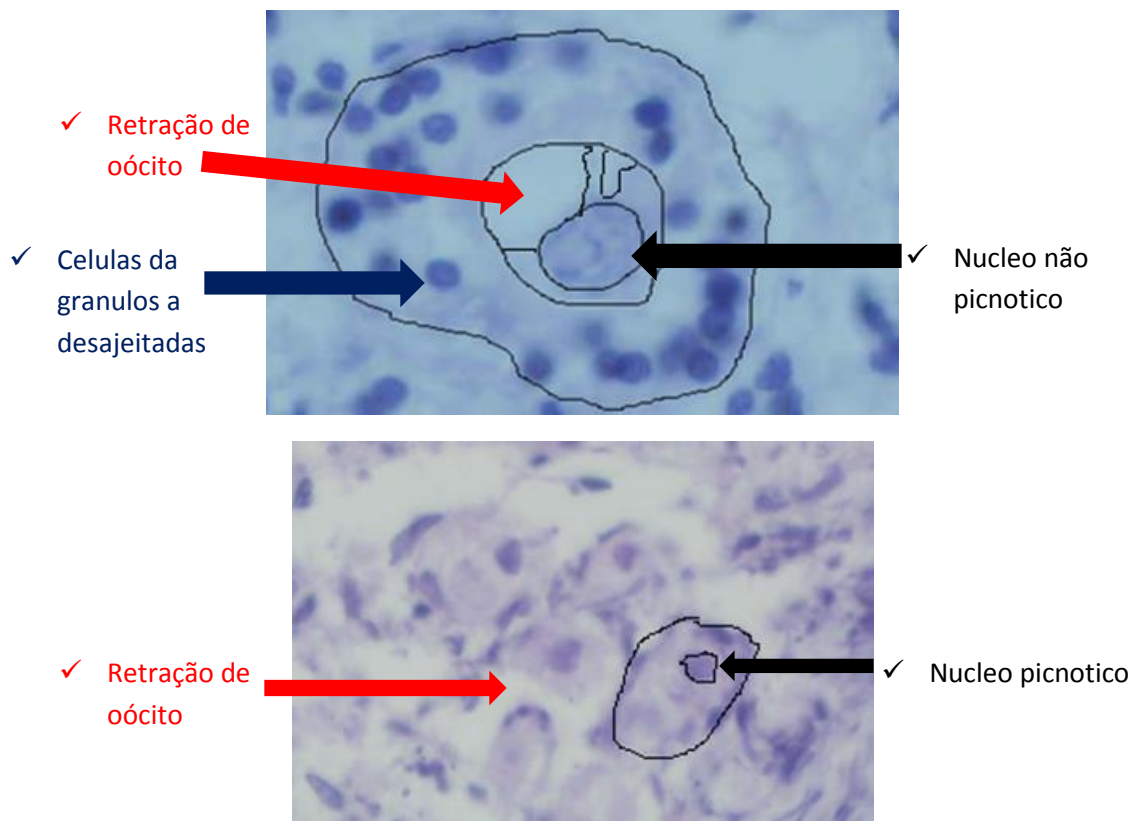
### E. AVALIAÇÃO DE TECIDO OVARIANO

Cada corte foi avaliado usando um microscópio (Nikon, Tokyo, Japão) com 400x de aumento, para realizar a classificação dos folículos em primordial, intermediário, primário e secundário, além de classificar os folículos em vivos e mortos (HULSHOF *et al.*, 1994, 1994):

Os folículos pré-antrais possuem diferentes características na sua avaliação para ser considerados vivos. Na seguinte imagem pode-se observar um folículo primário integro no cultivo *in vitro* de dia 1 sob influencia do extrato liofilizado de *Kefir*.



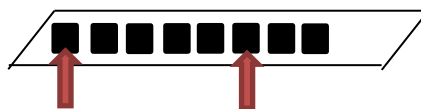
Os folículos pré-antrais mortos foram classificados por falta de Integridade de oócito e células da granulosa, presença ou ausência de corpos picnoticos, retração ooplasmica e organização das células da camada granulosa. Na seguinte imagem apresenta folículos mortos no dia sete e um de cultivo sob influencia do extrato liofilizado de *Kefir*.



OBS: Por cada extrato natural foram um total de 1650 folículos pré-antrais em 275 lamina histológicas avaliadas.

Em cada lâmina foram avaliados os cortes (pulando 5 cortes, depois da leitura dos folículos de um corte), cada um com 7 $\mu$ m de espessura, para analisar um total de 30 folículos por cada animal, nos fragmentos processados, ver figura 2.

Leitura nas lâminas de histologia.



Após a leitura os folículos foram tabulados nas seguintes tabelas (1, 2, e 3), apresentando os dados em percentual ao total dos trinta folículos avaliados por substancia por substância para conhecer o percentual de sobrevivência no grupo.

Depois de analisar sobrevivência foram transformando os dados em percentuais das medias das cinco replicatas dos folículos primordiais e os folículos em desenvolvimento, entendendo folículo em desenvolvimento, folículo intermediário, primário e secundário.



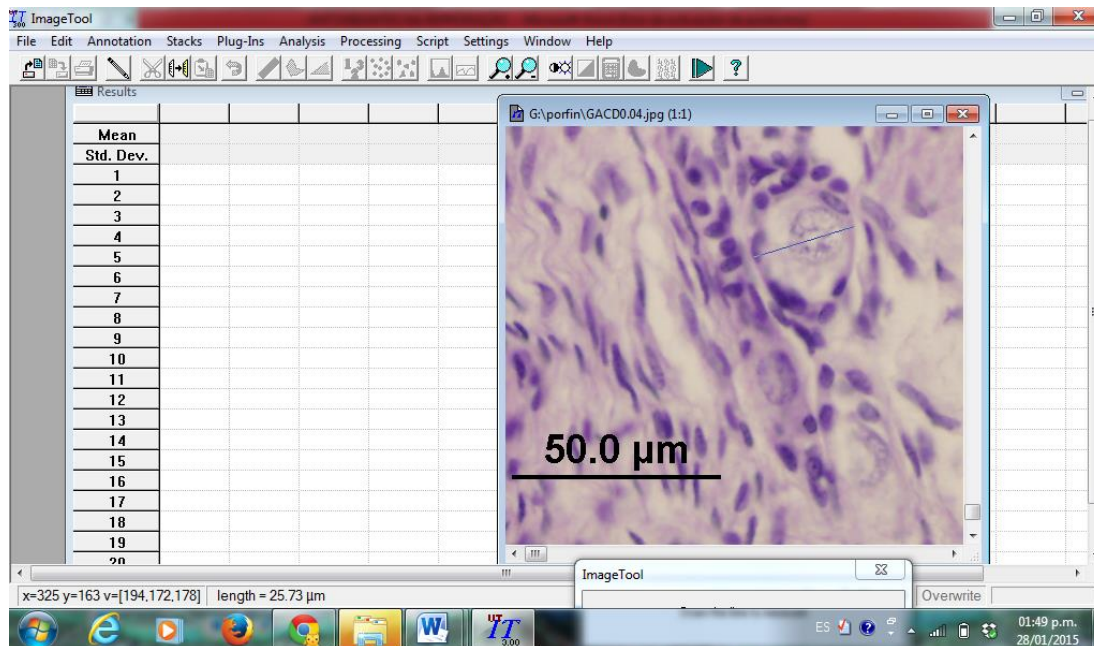
Figura 3, Gráfica para ajeitar os dados das meias dos diâmetros foliculares e oocitarios sob tratamento dos diferentes extratos, *Kefir* e *Spirulina maxima* nos dias de cultivo um e sete.

| Tratamentos |               | Diâmetro folicular ( $\mu\text{m}$ ) |                                  |    |     |     |   |                                  |    |     |     |  |
|-------------|---------------|--------------------------------------|----------------------------------|----|-----|-----|---|----------------------------------|----|-----|-----|--|
| Nome        |               | Dia 0                                | Dia 1 ( $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ) |    |     |     |   | Dia 7 ( $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ) |    |     |     |  |
|             | Tecido fresco | 0                                    | 10                               | 50 | 100 | 200 | 0 | 10                               | 50 | 100 | 200 |  |
|             |               |                                      |                                  |    |     |     |   |                                  |    |     |     |  |
|             |               |                                      |                                  |    |     |     |   |                                  |    |     |     |  |

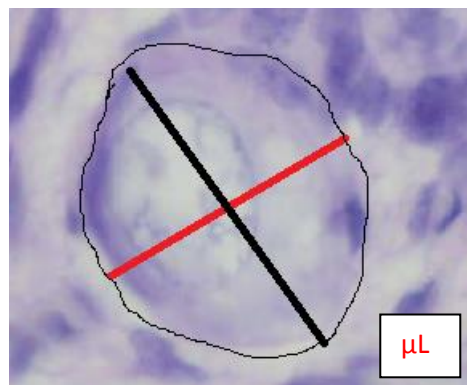
| Tratamentos |               | Diâmetro oocitário ( $\mu\text{m}$ ) |                                  |    |     |     |   |                                  |    |     |     |  |
|-------------|---------------|--------------------------------------|----------------------------------|----|-----|-----|---|----------------------------------|----|-----|-----|--|
| Nome        |               | Dia 0                                | Dia 1 ( $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ) |    |     |     |   | Dia 7 ( $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ) |    |     |     |  |
|             | Tecido fresco | 0                                    | 10                               | 50 | 100 | 200 | 0 | 10                               | 50 | 100 | 200 |  |
|             |               |                                      |                                  |    |     |     |   |                                  |    |     |     |  |
|             |               |                                      |                                  |    |     |     |   |                                  |    |     |     |  |

Por último para avaliar o crescimento folicular, foram obtidas as medidas dos diâmetros foliculares e oocitarios, foram fotografados folículos primordiais e folículos primários de cada animal e cada tratamento usando um microscópio (Nikon, Tokyo, Japão) com objetivo 400x de aumento para depois fazer as medidas de diâmetro com IMAGE TOOL.

Image Tool para tomar as medidas dos diâmetros foliculares.



Procedimento para medir o tamanho folicular, foram feitas duas medidas do folículo e delas fez-se a media para obter o tamanho do folículo em  $\mu\text{L}$ .



## ANEXO 2

### Protocolo de SDS-PAGE

#### 1. Solução A

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| Acrilamida            | 29,2 g |
| Bis-acrilamida        | 0,8 g  |
| Água destilada q.s.p. | 100 mL |

Filtrar e armazenar a 4°C ao abrigo da luz.

#### 2. Solução B (Tris-HCL 1,5M pH8,8)

|                       |         |
|-----------------------|---------|
| Tris                  | 18,15 g |
| Água destilada q.s.p. | 100 mL  |

Acertar o pH com HCL, filtrar e armazenar a 4°C.

#### 3. Solução C (Tris-HCL 0,5M pH 6,8)

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| Tris                  | 6 g    |
| Água destilada q.s.p. | 100 mL |

Acertar p pH com HCL, filtrar e armazenar a 4°C.

#### 4. SDS 10%

|                       |       |
|-----------------------|-------|
| SDS                   | 5 g   |
| Água destilada q.s.p. | 50 mL |

Filtrar e armazenar a temperatura ambiente.

#### 5. Persulfato de amônio 10% (PSA)

|                       |       |
|-----------------------|-------|
| Persulfato de amônio  | 1 g   |
| Água destilada q.s.p. | 10 mL |

Distribuir em alíquotas e armazenar a -20°C

#### 6. Tampão de amostra concentrado 2X sem redução

|           |        |
|-----------|--------|
| Solução C | 1 mL   |
| Glicerol  | 0,8 mL |
| SDS 10%   | 1,6 mL |

Água destilada 0,4 mL

Azul de bromofenol 2% 0,2 mL

Distribuir em alíquotas e armazenar a -20°C.

### 7. Tampão de corrida 5X

Tris 7.5 g

Glicina 36 g

SDS 2.5 g

Água destilada q.s.p. 500 mL

Armazenar a 4°C.

### 8. Procedimento

8.1 Usando luvas, limpar as placas de vidro com papel toalha umedecido com álcool 70%

8.2 Montagem das placas de vidro com espaçadores:

- Colocar a placa maior (não chanfrada) sobre a bancada
- Umedecer os espaçadores com água destilada e coloca-los paralelos nas margenes laterais e no fundo
- Colocar placa menor (chanfrada) sobre a placa maior, apoiando-a sobre os espaçadores
- Prender as placas com grampos e vedar as laterais e fundo do conjunto com agarose 1%
- Nivelar o conjunto com auxilio de um nível e ajustando por movimentação dos espaçadores do fundo

OBS: Existem muitos tipos de aparelhos para eletroforese disponíveis comercialmente, e o arranjo das placas e espaçadores difere de fabricante para fabricante.

8.3 Preparo do gel de separação:

|                | 7,5%    | 10%     | 12%     | 12.5%   | 15%     |
|----------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Solução A      | 2,5 mL  | 3,34 mL | 4 mL    | 4,17 mL | 5 mL    |
| Solução B      | 2,5 mL  | 2,5 mL  | 2,5 mL  | 2,5 mL  | 2,5 mL  |
| SDS 10%        | 0,1 mL  | 0,1 mL  | 0,1 mL  | 0,1 mL  | 0,1 mL  |
| Água destilada | 4,85 mL | 4 mL    | 3,35 mL | 3,16 mL | 2,34 mL |
| PSA 10%        | 70 µL   | 70 µL   | 70 µL   | 70 µL   | 70 µL   |

|       |           |           |           |           |           |
|-------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| TEMED | 7 $\mu$ L | 7 $\mu$ L | 7 $\mu$ L | 7 $\mu$ L | 7 $\mu$ L |
|-------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|

8.4 Misturar gentilmente e despejar o gel, rapidamente, no espaço entre as duas placas, cuidando para não formar bolhas. Em seguida, adicionar água destilada sobre a mistura.

8.5 Deixar a solução acrilamida:bis polimerizar por 30 minutos em temperatura ambiente

8.6 Retirar a água vertendo o conjunto e secar com papel de filtro

8.7 Preparo do gel de concentração

|                |            |
|----------------|------------|
|                | 4%         |
| Solução A      | 1,3 mL     |
| Solução B      | 2,5 mL     |
| SDS 10%        | 0,1 mL     |
| Água destilada | 6,1 mL     |
| PSA 10%        | 70 $\mu$ L |
| TEMED          | 7 $\mu$ L  |

8.8 Misturar gentilmente e despejar o gel, rapidamente, no espaço entre as duas placas, sobre o gel de separação. Inserir o pente, cuidando para não formar bolhas embaixo dos dentes

8.9 Deixar polimerizar por 30 minutos

8.10 Remover espaçador do fundo e colocar as placas no suporte para corrida (parte chanfrada para dentro) prendendo com os grampos

8.11 Preencher os reservatórios da cuba com tampão de corrida 1X e remover o pente

8.12 Remover bolhas do fundo do gel com auxílio de seringa e agulha

8.13 Preparo de amostras, diluir 1:1 no tampão de amostra concentrado 2X, levar ao banho-maria fervente por 3 minutos e depois de resfriadas aplicar nas canaletas

8.14 Conectar os fios de corrente a fonte, ligar a fonte e iniciar a corrida com voltagem em 100 V ou 30 mA

8.15 Interromper a corrida quando o marcador de azul de bromofenol chegar à parte inferior do gel. Desligar a fonte e desconectar os fios de corrente

8.16 Desunir as placas de vidro, remover a placa superior, com cuidado, retirar os espaçadores e destacar o gel preso à outra placa

## 9 Cuba electroforese Digel

### Volume total de solução de gel

| Tipo de gel                        | Total de volume de gel (1mm)* |
|------------------------------------|-------------------------------|
| Simples (um gel+placa de acrílico) | 7,5 mL                        |
| Duplo (dois géis)                  | 15 L                          |

\*Ajustes são necessários para géis moldados com espaçadores de 0,75 e 1,5 mm de espessura

Volume de trabalho: 800 mL

## 10. (A) Coloração *Coomassie Blue* (1L)

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| <i>Coomassie Blue</i> | 2.5 g  |
| Metanol               | 450 mL |
| Ácido acético glacial | 100 mL |
| Água milliQ           | 450 mL |

### 10.1 Solução descorante

|                 |     | <b>1000 mL</b> | <b>500 mL</b> |
|-----------------|-----|----------------|---------------|
| Álcool metílico | 30% | 300 mL         | 150 mL        |
| Ácido acético   | 10% | 100 mL         | 50 mL         |
| Água destilada  | 60% | 600 mL         | 300 mL        |

### 10.2 Solução fixadora de gel

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| Ácido acético glacial 10% (v/v) | 50 mL  |
| Água destilada                  | 450 mL |

### 10.3 Solução conservante

|                |        |
|----------------|--------|
| Álcool PA 100% | 10 mL  |
| Água destilada | 100 mL |

## 10 (B) Coloração pelo nitrato de prata

### **Solução de fixação**

Metanol 50% (v/v)

Ácido acético 5% (v/v)

### **Solução de metanol**

Metanol 50% (v/v)

### **Solução de tiosulfato**

Tiosulfato de sódio 0.02% (p/v)

### **Solução de coloração**

Nitrato de prata 0.1% (p/v)

### **Solução redutora (preparada no momento)**

Formaldeído 0.04% (v/v)

Carbonato de potássio 2% (p/v)

### **Solução de paragem**

EDTA 1.46% (p/v)

- 10.1 Após electroforese colocar o gel em solução de fixação durante 60 minutos, à temperatura ambiente (se necessário, deixar durante a noite).
- 10.2 Remover a solução anterior e incubar 60 min em solução de metanol
- 10.3 Descartar a solução de metanol e adicionar água ultrapura, incubando durante 10 minutos. Repetir esta lavagem duas vezes mais
- 10.4 Substituir a água por um pouco de solução de tiosulfato de sódio e incubar 15 minutos substituir por nova solução de tiosulfato sódico e incubar durante 2h30m
- 10.5 Rejeitar a solução anterior e enxaguar em água ultrapura (2 x 1 min)
- 10.6 Descartar a água e colocar o gel em solução de coloração durante 60 minutos
- 10.7 Rejeitar a solução anterior e enxaguar em água ultrapura
- 10.8 Rejeitar a água e colocar em solução redutora. Substituir esta solução por nova solução logo que fique amarelada e incubar até adquirir a intensidade de coloração desejada
- 10.9 Substituir a solução anterior pela solução de paragem
- 10.10 Descartar a solução de EDTA e substituir por água