

Eugenol melhora de maneira dose dependente a sobrevivência e o desenvolvimento de folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano caprino

R.F. Silva¹, A.F.B. Silva¹, L.F. Lima¹, A.P.R. Rodrigues¹, J.R. Figueiredo¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – UECE, Fortaleza, CE, Brasil.

Introdução

Estudos relacionados ao cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais *in situ* relataram perdas foliculares significativas (50 a 70%) que podem estar relacionadas a alta produção de espécies reativas de oxigênio, que levam ao estresse oxidativo. Uma alternativa a esse problema seria o uso de antioxidante no meio, como por exemplo o Eugenol (EUG), o qual é um derivado fenilpropanóide e está presente nos óleos essenciais de várias plantas. O EUG possui diversos efeitos farmacológicos, dentre eles podemos destacar o de antioxidante, e por isso, sua adição ao meio vem apresentando resultados promissores no cultivo *in vitro* de diversos tipos de células. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de eugenol no desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos.

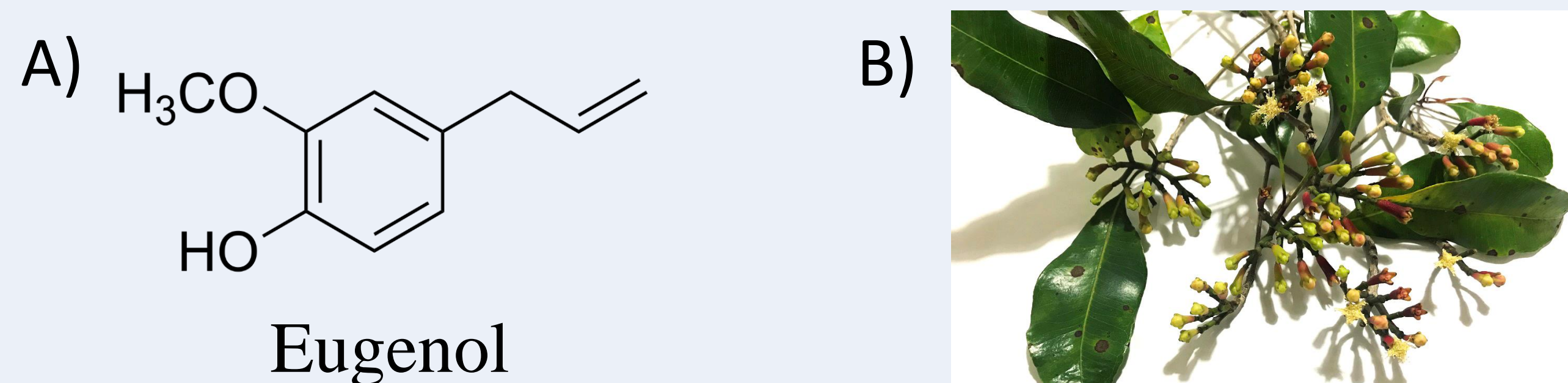


Figura 1: Fórmula estrutural do linalol e eugenol (A). O cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, Myrtaceae) rico em eugenol (B).

Metodologia

Para isso, fragmentos ovarianos foram cultivados por 1 e 7 dias em Alpha Meio Essencial Mínimo (α -MEM+) com ou sem antioxidantes. Sete grupos experimentais foram formados: Controle não cultivado; α -MEM+ (Controle cultivado); AA (Controle cultivado + Ácido ascórbico); ANE 300 (Controle cultivado + Anetol 300 μ g/mL); EUG 10, EUG 20 e EUG 40 (Controle cultivado + Eugenol acrescido de uma das concentrações de 10, 20 ou 40 μ M). Após o cultivo as amostras foram submetidas à análise histológica para avaliações de morfologia e ativação folicular. Este experimento foi repetido cinco vezes. Os dados foram submetidos à Análise de Variância, seguido de Teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

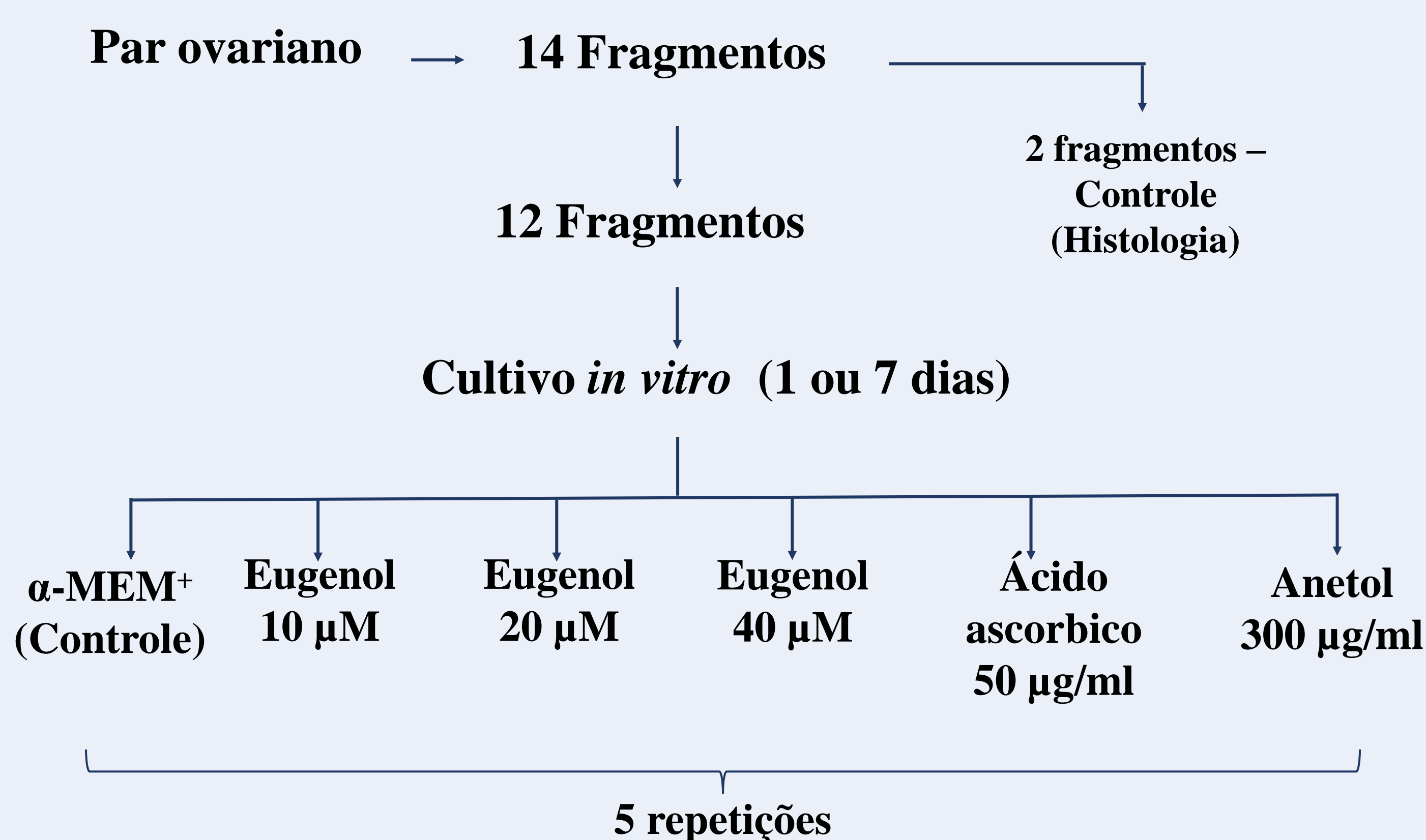


Figura 2. Protocolo experimental para o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos em meio α -MEM+ sozinho ou suplementado com diferentes concentrações de Eugenol (10, 20, 40 μ M), ácido ascórbico (50 μ g/mL) ou Anetol (300 μ g/mL).

Resultados e Discussão

Independente do período de cultivo, a adição de EUG na concentração de 40 μ M foi o único tratamento que manteve o percentual de folículos normais quando comparado ao controle não cultivado e α -MEM+. No que diz respeito a ativação folicular, exceto para o AA, a adição de ANE 300 e EUG em todas as concentrações testadas resultou em maiores taxas de desenvolvimento folicular quando comparado ao controle cultivado ($P < 0.05$). Vale salientar que as maiores taxas de folículos em desenvolvimento foram obtidas após utilização do EUG na concentração de 40 μ M ($P < 0.05$). Como relatado na literatura, o EUG 40 atuou como antioxidante reduzindo a produção de espécies reativas de oxigênio e melhorando a sobrevivência e o desenvolvimento folicular. O EUG pode aumentar a atividade de enzimas antioxidantes, neutralizando espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio que podem diretamente modificar as moléculas enzimáticas.

Tabela 1. Percentual de folículos caprinos morfológicamente normais e em desenvolvimento no tecido não cultivado e cultivado por 1 ou 7 dias em meio alfa-MEM sozinho ou acrescido de 50 μ g/mL de ácido ascórbico (AA), 300 mg/mL de anetol (AN 300) ou eugenol a 10 (EUG 10), 20 (EUG 20) ou 40 μ M/mL (EUG 40).

Tratamentos	Normais (%)		Desenvolvimento (%)	
	Dia 1	Dia 7	Dia 1	Dia 7
Controle (Dia 0)	85.95 \pm 3.49		14.50 \pm 4.7	
α -MEM+	71.42 \pm 2.28 ^{Aa*}	64.55 \pm 8.09 ^{Aa*}	28.20 \pm 0.90 ^{Ba*}	63.40 \pm 1.10 ^{Ab*}
AN 300	70.26 \pm 6.01 ^{Aa*}	74.43 \pm 7.75 ^{BCa*}	27.80 \pm 2.10 ^{Ba*}	72.50 \pm 3.00 ^{BCb*}
AA	71.73 \pm 2.40 ^{Aa*}	65.23 \pm 10.25 ^{ABa*}	25.70 \pm 1.40 ^{Ba*}	68.90 \pm 3.10 ^{ABb*}
EUG 10	74.11 \pm 3.88 ^{Aa*}	65.44 \pm 4.86 ^{ABb*}	26.10 \pm 1.60 ^{Ba*}	74.30 \pm 3.60 ^{BCb*}
EUG 20	79.04 \pm 3.51 ^{Ba}	63.86 \pm 9.50 ^{Ab*}	17.40 \pm 3.40 ^{Aa}	77.80 \pm 2.90 ^{Cb*}
EUG 40	82.44 \pm 2.62 ^{Ba}	79.92 \pm 5.04 ^{Ca}	11.10 \pm 1.50 ^{Aa}	85.50 \pm 2.20 ^{Db*}

^{A,B,C} Valores diferem tratamentos no mesmo dia de cultivo ($P < 0.05$). ^{a,b} Valores diferem entre dias de cultivo no mesmo tratamento ($P < 0.05$). * Valores diferem do Controle ($P < 0.05$).

Considerações finais

Baseado no exposto, conclui-se que o EUG 40 melhora a sobrevivência e ativação de folículos pré-antrais caprinos incluso em tecido ovariano e cultivados por 7 dias. Estudos posteriores vêm sendo realizados para observação de efeitos positivos do Eugenol em fases mais avançadas do desenvolvimento folicular, bem como no desenvolvimento embrionário.

Referências

Sá, N.A.R.; Bruno, J.B.; Guerreiro, D.D.; Cadenas, J.; Alves, B.G.; Cibin, F.W.S.; Leal-Cardoso, J.H.; Gastal, E.L.; Figueiredo, J.R. Anethole reduces oxidative stress and improves *in vitro* survival and activation of primordial follicles. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 51, 2018.

Mateen, S., Rehman, Md T., Shahzad, S., Naeem, S.S., Faizy, A.F., Khand, A.Q., Khane, Mohd.S., Husain, F.M., Moin, S. Anti-oxidant and anti-inflammatory effects of cinnamaldehyde and eugenol on mononuclear cells of rheumatoid arthritis patients. *European Journal of Pharmacology*, v. 852, p. 14–24, 2019.