EFEITOS CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA DO ANETOL SOBRE A MATURAÇÃO OOCITÁRIA E PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES NA ESPÉCIE CAPRINA

Alesandro Silva Ferreira[1]
Anna Clara Accioly Ferreira[2]
José Ricardo De Figueiredo[3]
André Luiz Da Conceição Santos[4]
Juliana Jales De Hollanda Celestino[5]

RESUMO

O objetivo deste estudo consistiu em analisar a resposta oocitária à presença do antioxidante anetol durante a MIV de oócitos sobre as taxas de maturação e PIVE na espécie caprina. Para tanto, CCO oriundos de slincing de ovários frescos, foram selecionados e lavados em meio de MIV (TCM 199+). Para avaliar o efeito do anetol adicionado ao meio de MIV, os CCO foram foram distribuídos aleatoriamente e maturados na ausência (tratamento controle) ou presença de 30 µg/mL (tratamento AN30), 300 µg/mL (tratamento AN300) ou 2000 µg/mL (tratamento AN2000) de anetol. Os oócitos foram maturados em grupo (10 µL de meio/COC) sob óleo mineral a 38,5 °C com 7,5% de CO2 no ar por 24 h. Ao fim, parte dos CCO foi destinada para avaliação da viabilidade e configuração da cromatina e outra parte destinada para ativação oocitária partenogenética e posterior avaliação do desenvolvimento embrionário. Observou-se que AN30 aumentou as taxas de MII e de clivagem quando comparado aos outros tratamentos, assim como a viabilidade e a produção de embriões in vitro quando comparado ao tratamento controle. Além disso, o tratamento com anetol a 2000 µg/mL diminuiu as taxas de maturação oocitária e de clivagem de clivagem quando comparado a outros tratamentos e a produção de embriões se comparado aos tratamentos controle e AN30. Em conclusão, o anetol exerceu um efeito dependente da concentração durante a MIV de COCs de cabra.

Palavras-chave: Maturação oocitária; Estresse oxidativo; Produção de embriões; Caprinos.

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências da Saúde, Discente, silvaalesandro90@gmail.com[1]
Universidade Estadual do Ceará, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Discente, anna.accioly@uece.br[2]
Universidade Estadual do Ceará, Programa de Pós-graduação em Ciências veterinárias, Docente, figueiredo.lamofopa@gmail.com[3]
Universidade Estadual do Ceará, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Discente, andreconceicao.mv@gmail.com[4]
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências da Saúde, Docente, juliana.celestino@unilab.edu.br[5]

ISSN: 2447-6161

INTRODUÇÃO

A maturação in vitro (MIV) é uma biotécnica que visa proporcionar a aquisição de oócitos competentes, aptos à fertilização e posterior desenvolvimento embrionário (Hyttel et al, 1997). Associada à produção in vitro de embriões (PIVE), visa prover um largo número de oócitos maturos que possam ser utilizados em escala produtiva. Pode ser também uma ferramenta aplicada à reprodução humana, compondo as tecnologias de reprodução assistida, e ainda, aplicada à pesquisa básica. Contudo, no contexto da produção animal, esta tecnologia ainda resulta em baixo número de embriões e de má qualidade. A dificuldade em se produzir bons resultados está correlacionada a vários fatores, incluindo o estresse oxidativo (EO) durante a maturação in vitro.

Diante dos efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio (EROs) e EO sobre os componentes celulares, sobrevivência e competência oocitária, diversos autores buscam aprimorar os meios de maturação in vitro de oócitos caprinos, fazendo suplementação com substâncias, especialmente de origem natural, com potencial antioxidante, . Em destaque, estudos recentes vêm demonstrando os efeitos benéficos da capacidade antioxidante no anetol na MIV (Sá et al., 2019) e cultivo in vitro de embriões (Anjos et al., 2019). Nos últimos anos, esse composto apresentou resultados promissores quando associados a biotécnicas reprodutivas, especialmente no cultivo in vitro folicular (Sá et al., 2017; Sá et al., 2018; Sá et al., 2020) e na MIV de bovinos (Sá., 2019, Anjos et al., 2019, Janini et al., 2023).

Embora efeitos positivos do anetol tenham sido atribuídos a partir de sua inclusão em meios de cultivo para finalidades distintas, até o momento não foi avaliado o efeito do anetol em diferentes concentrações em adição ao meio de maturação in vitro na espécie caprina. Diante disso, esse estudo objetivou avaliar os efeitos do anetol no meio de maturação de oócitos de caprinos sobre a taxas de maturação oocitária, viabilidade e as taxas de clivagem e de blastocistos e o número de células por blastocisto após ativação partenogenética.

METODOLOGIA

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE; No 01539310/2022.).

Para este fim, ovários de cabras adultas sem raça definida foram coletados em abatedouro local e transportados ao laboratório em MEM-HEPES com antibióticos por no máximo 2 h a 33-35°C (Sá et al., 2020).

No laboratório, os ovários foram lavados em meio MEM-HEPES suplementado com penicilina (100 µg/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). Em seguida, os COC foram recuperados de folículos antrais localizados no córtex ovariano por slicing usando lâminas cirúrgicas (n°24) sob condições estéreis. Os CCO foram selecionados em solução salina tamponada com fosfato Dulbecco (D-PBS) suplementada com glicose (5,56 mM), piruvato de sódio (1,25 mM), heparina sódica (15 µg/mL), vermelho de fenol (8 µg/mL) e canamicina (10 µg/mL), sob estereomicroscópio (SMZ 645 Nikon, Tóquio, Japão), e imediatamente destinados para a MIV.

Para avaliar o efeito do anetol adicionado ao meio de MIV de oócitos caprinos, os COC foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes tratamentos, a saber: 1) Oócitos maturados in vitro na ausência (tratamento controle) ou presença de 30 µg/mL (tratamento AN30), 300 µg/mL (tratamento AN300) ou 2000 µg/mL (tratamento AN2000) de anetol. Os CCO foram distribuídos aleatoriamente e incubados em grupo em gotas de meio na proporção 10 µL de meio/COC sob óleo mineral a 38,5 °C e em atmosfera umidificada com 7,5% de CO2 no ar por 24 horas. O meio de base consistiu em meio de cultivo de tecido 199 (TCM-199) suplementado com 1 µg/mL de 17-β-estradiol, 5 µg/mL de hormônio luteinizante (LH), 0,5 µg/mL de hormônio

ISSN: 2447-6161

folículo estimulante recombinante (rFSH), 10 ng/mL de fator de crescimento epidérmico (EGF), 1 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), 22 µg/mL de piruvato, 50 ng/mL de fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) e 100 µM/L de cisteamina (CADENAS et al., 2017), denominado como TCM199+. O experimento foi replicado cinco vezes e 30 oócitos foram usados por tratamento.

Após a MIV, para avaliação da configuração da cromatina por fluorescência, parte dos COC de cada tratamento foram desnudados mecanicamente e incubados individualmente com Hoechst 33342 e 1% de glutaraldeído, e processados como descrito previamente (Cadenas et al., 2017). De acordo com a configuração da cromatina, os oócitos foram classificados como vesícula germinativa (VG), metáfase I (MI), metáfase II (MII), ou degenerado, quando a cromatina apresentava a configuração anormal.

Após a MIV, os COC restantes foram desnudados e destinados à ativação partenogenética e cultivo embrionário. Para este fim, oócitos foram incubados em meio TCM-HEPES, contendo soro fetal bovino (FBS) e ionomicina, em fase escura, e posteriormente em 6-DMAP por 4 horas. Após isso, os presumíveis zigotos foram lavados em meio de cultivo embrionário 1(G1 TM, Vitrolife, Gothemburg, Sweden) suplementado com BSA e cultivados neste mesmo meio durante 3 dias. Depois, os embriões foram avaliados quanto ao percentual de clivagem, sendo realizada a troca total de meio G1 para o meio de cultivo embrionário 2 (G2 TM, Vitrolife, Gothemburg, Sweden), e cultivados por mais 4 dias. O cultivo embrionário in vitro foi realizado a 38,5 °C e 5 % de CO2, por 7 dias. Após o cultivo embrionário, os embriões foram fixados em PBS com 0,1 % de BSA e 1% de glutaraldeído e incubados em Hoechst 33342 para análise da qualidade dos blastocistos. Após confecção em lâminas, os embriões foram examinados sob um microscópio invertido equipado com epifluorescência (Nikon, Eclipse 80i, Tóquio, Japão), usando o programa NIS - Elements (versão de software 3.00).

As análises estatísticas foram desenvolvidas no software de projeto R. A normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e a homogeneidade de variância (teste de Levene) foram previamente avaliadas. A comparação de médias ad hoc foi analisada por meio de ANOVA unidirecional seguida pelo teste post-hoc de Tukey. As variáveis categóricas, resultantes em proporções foram analisadas entre os tratamentos pelo teste do Qui quadrado. Todos os valores são apresentados como média (± erro padrão da média, EPM) ou percentuais, de acordo com cada variável estudada. A significância estatística foi definida como P

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esse trabalho é o primeiro relato na literatura da utilização do anetol como suplemento e seus efeitos na maturação in vitro de oócitos e posterior produção de embriões na espécie caprina.

O número de oócitos submetidos à MIV, taxas de oócito em vesícula germinativa, ruptura de vesícula germinativa (RVG), metáfase I, metáfase II e oócitos degenerados são mostrados na tabela 1. Nenhuma das concentrações de anetol utilizadas influenciou no estágio de VG comparado ao controle (P>0,05). Apesar disso, as taxas de RVG e MI foram superiores em AN2000 comparados a AN30 e AN300 (P0,05).

Tabela 1. Porcentagem de oócitos degenerados (DEG), vesícula germinativa (VG), ruptura da vesícula germinativa (RVG), metáfase I (MI) e metáfase II (MII).

ISSN: 2447-6161

Tratamento	Oócitos degenerados (%)	VG(%)	RVG (%)	MI(%)	MII(%)	Retomada da meiose (%)
Controle	22,89 (19/83)^{A}	8,43 (7/83)^{AB}	2,41 (2/83)^{B}	16,87 (14/83)^{AB}	49,4 (41/83)^{B}	68,67 (57/83)^{A}
AN30	8,20 (5,61)^{B}	9,84 (6/61)^{AB}	0,00 (0/61)^{B}	8,20 (5/61)^{B}	73,77 (45/61)^{A}	81,97 (50/61)^{A}
AN300	19,44 (14/72)^{AB}	12,50 (9/72)^{A}	4,17 (3/72)^{B}	9,72 (7/72)^{B}	54,17 (39/72)^{B}	68,06 (49/72)^{A}
AN2000	15,28 (11/72)^{AB}	2,78 (2/72)^{B}	27,78 (20/72)^{A}	26,39 (19/72)^{A}	27,78 (20/72)^{C}	81,94 (59/72)^{A}

A-C indicam diferenças significativas entre os tratamentos.

Em trabalhos com a espécie bovina, Sá et al. (2019) e Anjos et al. (2019) observaram que a suplementação da MIV com anetol em diferentes concentrações (30 µg/mL, 300 µg/mL ou 2000 µg/mL) não foi eficaz em aumentar a taxa de oócitos maturados em relação ao tratamento controle. Diferentemente desses achados, o presente trabalho demonstrou um efeito concentração-dependente do anetol na maturação nuclear de oócitos caprinos maturados in vitro. Nossos achados demonstram que menores concentrações de anetol (30 µg/mL) resultaram em maiores taxas de maturação oocitária.

As taxas de clivagem e produção de embriões (mórula+blastocistos) após ativação partenogenética e cultivo embrionário são mostradas nas Figuras 1A e 1B, respectivamente. Maiores taxas de clivagem foram observadas no tratamento AN30 em comparação aos demais tratamentos (P0,05). AN2000 reduziu de forma significativa a produção de embriões em relação aos demais tratamentos.

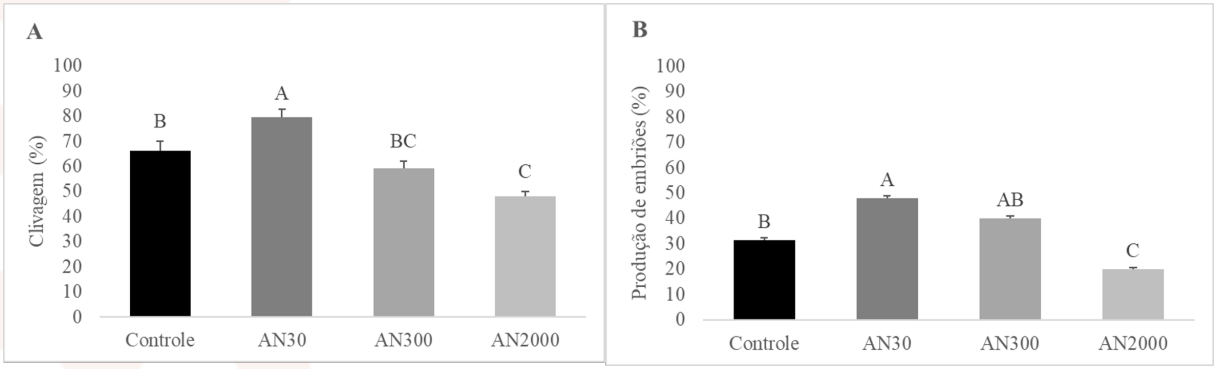

Figura 1. Efeitos da suplementação com anetol na MIV sobre marcadores de estresse oxidativo. Unidades arbitrárias de fluorescência para potencial de membrana mitocondrial (A) EROs intracelular (B) e níveis de peróxido de hidrogênio no meio de MIV (C). A-B indicam diferenças significativas entre os tratamentos.

No presente estudo, a suplementação de anetol a 30 µg/mL durante a MIV aumentou tanto a taxa de clivagem quanto a produção de embriões partenotos. Um estudo recente mostrou que o anetol promoveu a ativação da via de sinalização Sonic Hedgehog (SHH) em embriões suínos de 2 dias (Joo et al., 2023). Curiosamente, a suplementação de proteína SHH durante MIV de oócitos caprinos (Wang et al., 2017) resultou em maiores taxas de MII, e subsequentemente, na produção de embriões. A sinalização SHH é uma via crucial para a proliferação e diferenciação celular, atuando como um regulador bem conhecido do ciclo celular (Araújo et al., 2014). Consequentemente, no estudo atual, é plausível que as melhorias observadas na maturação do oócito e na produção subsequente de embriões após a suplementação de anetol durante a MIV possam ser atribuídas à ativação da via de sinalização SHH dentro dos COCs. No entanto, essa hipótese deve ser testada em estudos posteriores. O efeito da suplementação de anetol durante a MIV impactando a produção de embriões foi observado anteriormente em espécies bovinas, nas quais 300 µg/mL aumentaram

ISSN: 2447-6161

as taxas de clivagem, o desenvolvimento do embrião (Sá et al., 2019) e a produção de blastocistos (Anjos et al., 2019) após a fertilização in vitro e cultivo embrionário, demonstrando que o efeito da suplementação de anetol durante a MIV impacta diretamente o desenvolvimento subsequente do embrião. Neste estudo, a suplementação de anetol durante a MIV de COCs caprinos produziu maiores taxas de produção de embriões in vitro (mórulas e blastocistos) em comparação com outros estudos que usaram crocetina (Menéndez-Blanco et al., 2020) e ácido alfa-lipóico (He et al., 2021) como antioxidantes em espécie caprina.

CONCLUSÕES

Em conclusão, o anetol exerce um efeito dependente da concentração durante a maturação in vitro de COCs caprinos. A suplementação do meio de base de MIV com 30 µg/mL de anetol melhorou a viabilidade oocitária, maturação nuclear e ainda levou ao aumento adicional in vitro na produção de embriões em cabras.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Funcap) pelo financiamento da pesquisa intitulada “Efeito da utilização do antioxidante anetol sobre a maturação oocitária e subsequente produção in vitro de embriões caprinos” e executada entre 01/09/2023 e 31/08/2024, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (Pibic) e Tecnológica (Pibiti), da UNILAB.

REFERÊNCIAS

ANJOS, J. C.; AGUIAR, F. L. N.; SÁ, N. A. R.; SOUZA, J. F.; CIBION, F. W. S.; ALVES, B. G.; SANTOS, R. R.; FIGUEIREDO, J. R. Anethole improves blastocysts rates together with antioxidant capacity when added during bovine embryo culture
rather than in the in vitro maturation medium. Zygote, v. 27, n. 6, p. 382-385, 2019.

ARAÚJO, G. L. L.; ARAÚJO, J. A. M.; SCHROEDER, T.; TORT, A. B. L.; COSTA, M. R. Sonic hedgehog signaling regulates mode of cell division of early cerebral cortex progenitors and increases astrogliogenesis. Frontiers in cellular neuroscience, v. 8, p. 77, 2014.

CADENAS, J.; LEIVA-REVILLA, J.; VIEIRA, L. A.; APOLLONI, L. B.; AGUIAR, F. L. N.; ALVES, B. G.; LOBO, C. H.; RODRIGUES, A. P. R.; APGAR, G. A.; SMITZ, J.; FIGUEIREDO, J. R.; MASIDE, C. Caprine ovarian follicle requirements differ between preantral and early antral stages after IVC in medium supplemented with GH and VEGF alone or in combination. Theriogenology, v. 87, p. 321–332, 2017.

HE, Y.; WANG, Y.; ZHANG, H.; ZHANG, Y.; QUAN, F. Alpha-lipoic acid improves the maturation and the developmental potential of goat oocytes in vitro. Reproduction in Domestic Animals, v. 56, n. 4, p. 545-554, 2021.

MENÉNDEZ-BLANCO. I.; SOTO, S.; CATALÁ, M. G.; ROURA, M.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, M. T. Effect of crocetin added to IVM medium for prepubertal goat oocytes on blastocyst outcomes after IVF, intracytoplasmic sperm injection and parthenogenetic activation. Theriogenology, v. 155, p. 70-76, 2020.

SÁ, N. A. R.; ARAÚJO, V. R.; CORREIA, H. H. V.; FERREIRA, A. C. A.; GUERREIRO, D. D.; SAMPAIO, A. M.; ESCOBAR, E.; SANTOS, F. W.; MOURA, A. A.; LÔBO, C. H.; CECCATTO, V. M.; CAMPELLO, C. C.; RODRIGUES, A. P. R.; LEAL-CARDOSO, J. H.; FIGUEIREDO, J. R. Anethole improves the in vitro development of isolated caprine secondary follicles. Theriogenology, v. 89, n. 2016, p. 226–234, 2017.

SÁ, N. A. R.; BRUNO, J. B.; GUERREIRO, D. D.; CADENAS, J.; ALVES, B. G.; CIBIN, F. W. S.; LEAL-

ISSN: 2447-6161

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, n. 8, p. 1–8, 2018.

SÁ, N. A. R.; VIEIRA, L, A.; FERREIRA, A. C. A.; CADENAS, J.; BRUNO, J. B.; MASIDE, C.; SOUSA, F. G. C.; CIBIN, F. W. S.; ALVES, B. G.; RODRIGUES, A. P. R.; LEAL-CARDOSO, J. H.; GASTAL, E. L.; FIGUEIREDO, J. R. Anethole supplementation during oocyte maturation improves in vitro production of bovine embryos. Reproductive Sciences, v. 27, p. 1602-1608, 2019.

SÁ, N. A. R.; FERREIRA, A. C. A.; SOUSA, F. G. C.; DUARTE, A. B. G.; PAES, V. M.; CADENAS, J.; ANJOS, J. C.; FERNANDES, C. C. L.; ROSSETO, R.; CIBIN, F. W. S.; ALVES, B. G.; RODRIGUES, A. P. R.; RONDINA, D.; GASTAL, E. L.;
FIGUEIREDO, J. R. First pregnancy after in vitro culture of early antral follicles in goats: Positive effects of anethole on follicle development and steroidogenesis. Molecular Reproduction and Development, v. 87, n. 9, p. 966–977, 2020.

WANG, D. C.; HUANG, J. C.; LO, N. W.; CHEN, L. R.; MERMILLOD, P.; MA, W. L. Sonic Hedgehog promotes in vitro oocyte maturation and term development of embryos in Taiwan native goats. Theriogenology, v. 103, p. 52-58, 2017.

WATSON, A. J. Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. Journal of Animal Science, v. 85 (13 Suppl), p. 2004-2006, 2007.

ISSN: 2447-6161