INFLUÊNCIA DA UTILIZAÇÃO DO ANTIOXIDANTE ANETOL SOBRE A SOBREVIVÊNCIA, DESENVOLVIMENTO E PERFIL DE METILAÇÃO DE FOLÍCULOS OVARIANOS CAPRINOS CULTIVADOS IN VITRO

Alesandro Silva Ferreira[1]
Ana Flávia Bezerra Da Silva[2]
José Ricardo De Figueiredo[3]
Rebeca Magalhães Pedrosa Rocha[4]
Juliana Jales De Hollanda Celestino[5]

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da adição do antioxidante anetol sobre a sobrevivência, o desenvolvimento e o perfil de metilação de folículos ovarianos caprinos cultivados *in vitro*. Para tanto, ovários caprinos foram coletados em abatedouro local e de cada par ovariano, folículos secundários tardios (FOPAs) e antrais iniciais (FOAs) foram mecanicamente isolados. Os FOAs e uma parte dos FOPAs foram denominados controle não cultivado/fresco (D0), os quais foram analisados quanto ao perfil de metilação (PM) do DNA através da técnica de imunofluorescência. Os demais FOPAs foram destinados ao cultivo *in vitro* nos seguintes tratamentos: meio de base alfa-Meio Essencial Mínimo modificado (α-MEM+) na ausência (tratamento controle cultivado) ou presença de 300 µg/mL de anetol (tratamento anetol). Os folículos foram cultivados individualmente em gotas de 100 µL de meio em placa de Petri sob óleo mineral, a 38,5°C e 7,5% de CO2 em atmosfera, durante 6 dias. Os parâmetros avaliados foram: morfologia, sobrevivência, desenvolvimento folicular e o perfil de metilação do DNA dos folículos antes e após o cultivo *in vitro*, além dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs). Observou-se que após 6 dias de cultivo, nenhum dos parâmetros relacionados à morfologia e desenvolvimento folicular (folículos normais, extrusos ou degenerados, taxa de formação de antro, diâmetro folicular e taxa de crescimento diário) apresentou diferença entre os tratamentos ($P > 0,05$). Nesse mesmo sentido, as taxas de EROs foram semelhantes entre os tratamentos (controle cultivado x anetol - $P > 0,05$). Em relação ao PM, FOAs crescidos *in vitro* apresentaram maiores ($P < 0,05$) níveis de H3K4me3 nos oócitos e CG, quando comparado *in vivo* (FOPAs tardios e FOAs iniciais). Em conclusão, o PM folicular sofreu alteração durante a formação da cavidade antral *in vitro* (transição de FOPAs para FOAs).

Palavras-chave: alterações epigenética; estresse oxidativo; cultivo in vitro; folículos ovarianos.

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira, Instituto de Ciênicas da Saúde- iCS, Discente, silvaalesandro90@gmail.com[1]
Universidade estadual do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária, Discente, af.biomedica@gmail.com[2]
Universidade Estadual do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Docente, figueiredo.lamofopa@gmail.com[3]
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira, Instituto de Ciências da Saúde-ICS, Docente, rebecarocha@unila.edu.br[4]
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira, Instituto de Ciências da Saúde-ICS, Docente, juliana.celestino@unilab.edu.br[5]

ISSN: 2447-6161

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, diferentes biotecnologias no campo da reprodução assistida, tanto em humanos como em animais, têm sido desenvolvidas para o tratamento de infertilidade humana, bem como para maximizar a reprodução de animais de alto valor zootécnico. Dentre essas biotécnicas reprodutivas, destaca-se o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos, também conhecido como ovário artificial. O cultivo *in vitro* folicular (CIVF) permite recuperar os folículos ovarianos pré antrais (FOPAs) e antrais (FOAs) antes que se tornem atrésicos, cultivá-los até sua completa maturação, para obter um grande número de oócitos competentes que poderão ser utilizados por outras biotécnicas, como a produção *in vitro* de embriões (PIVE; FIGUEIREDO et al., 2019). Em caprinos, os resultados mais promissores do CIVF de FOPAs alcançaram apenas baixas taxas de oócitos maturos e de embriões produzidos (MAGALHÃES et al., 2011). Nessa mesma espécie, o CIVF de FOAs já alcançou uma representativa taxa de oócitos maturos (57,7%) e prenhez (SÁ et al., 2020). Esse baixo rendimento pode estar ligado às condições *in vitro*, como a composição inadequada do meio e a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs - estresse oxidativo). O estresse oxidativo pode causar danos aos componentes celulares (organelas e DNA), resultando em anormalidades epigenéticas, como alteração no perfil de metilação (PM) do DNA (YU et al., 2018).

O perfil de metilação (PM) do DNA, envolve a adição do radical (CH3) nos resíduos de lisina (K) das histonas, que podem normalmente ativar ou silenciar a expressão gênica durante os processos de oogênese, foliculogênese e embriogênese (SENEDA et al., 2008; SOUZA-CÁCERES et al., 2017). Trimetilação de H3K4me3 está associada com a ativação, enquanto a H3K9me3 está associada com o silenciamento da expressão gênica, o que tem um papel crítico na regulação de diversos processos reprodutivos (YU et al., 2018). O nível de metilação nos resíduos K é controlado por enzimas lisinas metiltransferases (KTMs) que transferem o CH3, e lisinas desmetilases (KDMs) que removem o CH3. Dentre as KDMs, destacam-se a KDM1A de H3K4me3 e KDM3A de H3K9me3 (LIU et al., 2020). Diversos autores têm observado que o EO no CIVF ocasiona um desbalanço no PM, afetando principalmente a expressão de genes que codificam fatores parácrinos e enzimas cruciais para a regulação gênica (YU et al., 2018).

Estudos têm demonstrado que os antioxidantes podem ter um papel importante na regulação do PM *in vitro* (YU et al., 2018; SAEEDABADI et al., 2018). Nossa equipe mostrou pela primeira vez o efeito do antioxidante anetol durante o CIVF de FOPAs e FOAs iniciais isolados (caprino: SÁ et al., 2017, SÁ et al., 2020). Entretanto, apesar dos resultados encorajadores com o anetol, o seu impacto sobre a regulação epigenética em folículos cultivados *in vitro* não é conhecido. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos do anetol durante a transição de FOPAs (secundários tardios) para FOAs (antrais iniciais) caprinos isolados formados *in vitro*, dando enfoque ao PM.

METODOLOGIA

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE; No 00609605/2020).

Para este fim, ovários de cabras adultas sem raça definida (n= 72) foram coletados em abatedouro local, e transportados ao laboratório em MEM-HEPES por no máximo 1 h a 4 °C (CHAVES et al., 2008).

Folículos pré-antrais secundários tardios (FOPAs) e antrais iniciais (FOAs) foram isolados e selecionados e, logo após, todos os FOAs (n=33) e parte dos FOPAs (n=24) foram aleatoriamente destinados ao controle fresco/não cultivado (D0) para avaliação do perfil de metilação do DNA (PM). Os demais FOPAs (n= 94) foram destinados, aleatoriamente, ao cultivo *in vitro*, nos seguintes tratamentos: meio de base α-MEM modificado (α-MEM+) na ausência (tratamento controle cultivado - n= 47) ou presença de 300 µg/mL de anetol (tratamento anetol - n= 47; SÁ et al., 2017). Os FOPAs foram cultivados individualmente por 6 dias em

ISSN: 2447-6161

gotas de 100 µL de meio de base sob óleo mineral, a 38,5oC em atmosfera umidificada com 7,5% de CO2, durante 6 dias.

Ao final do cultivo, os folículos oriundos dos diferentes tratamentos *in vitro* (FOPA tardios que não formaram antro e FOA iniciais crescidos *in vitro*) foram avaliados quanto a morfologia folicular (sobrevivência, diâmetro, taxa de crescimento e formação de antro) utilizando estereomicroscópio e histologia. No entanto, somente os folículos que formaram antro durante o cultivo, e que consequentemente geraram FOA iniciais crescidos *in vitro* foram avaliados quanto aos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) no meio coletado, após o cultivo. Cabe salientar que tanto nos FOPA e FOA não cultivados (secundários tardios e antrais iniciais), como nos folículos antrais iniciais crescidos *in vitro* foi avaliado o PM, por meio da imunolocalização das proteínas histonas H3K4me3 e H3K9me3.

Os dados estatísticos foram apresentados como média (± EPM) ou percentagem. Para comparação de médias foi utilizada ANOVA seguida por um teste LSD de Fisher, e teste T não pareado para comparações entre grupos. A associação entre as variáveis foi avaliada pelo teste de correlação de Pearson. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo investigou pela primeira vez o impacto do anetol sobre o perfil de metilação do DNA (H3K4me3 e H3K9me3) em folículos cultivados *in vitro*.

Relacionado a morfologia folicular após o cultivo *in vitro*, foi possível observar que as taxas de folículos morfologicamente normais, extrusos ou degenerados, a taxa de formação de antro e ainda as taxas de diâmetro folicular e crescimento diário não diferiram entre os tratamentos (controle e anetol) ($P > 0,05$). De forma semelhante, os níveis de EROs avaliados nos meios de cultivo coletados foram semelhantes ($P > 0,05$) entre os tratamentos controle e anetol, após 6 dias de cultivo.

Os níveis de H3K4me3 e H3K9me3 foram semelhantes ($P > 0,05$) entre os oócitos e células da granulosa de todas as categorias foliculares estudadas (FOPAs tardios e FOAs iniciais crescidos in vivo, bem como FOA iniciais crescidos *in vitro* na ausência ou presença de anetol). Independente do compartimento folicular (oócitos ou CG), níveis similares de H3K4me3 e H3K9me3 ($P > 0,05$) foram observados entre FOPAs e FOAs crescidos in vivo.

Quando os FOAs crescidos *in vitro* foram considerados, níveis superiores ($P < 0,05$) de H3K4me3 nos oócitos e CG foram observados no tratamento anetol, quando comparado ao controle cultivado. Ainda, quando os FOAs crescidos *in vitro* foram comparados aos folículos crescidos in vivo, resultados distintos foram obtidos no tratamento controle e anetol. Por exemplo, FOAs iniciais crescidos *in vitro* no tratamento anetol apresentaram maiores ($P < 0,05$) níveis de H3K4me3 nos oócitos e CG, quando comparado aos oócitos e CG dos folículos crescidos in vivo (FOPAs tardios e FOAs iniciais).

A metilação nos resíduos K4 e K9 da histona H3 nas GC está envolvida com a regulação da foliculogênese decorrente da dinâmica transcrição gênica nesse processo, o qual exige uma modulação da cromatina (SENEDA et al., 2008). Um estudo prévio realizado pela nossa equipe, utilizando folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano revelou níveis semelhantes de H3K4me3 entre os folículos primordiais e em desenvolvimento (SILVA et al., 2022). A presença de H3K4me3 foi detectada em oócitos e CG, desde o estádio de folículo primário até folículos antrais suínos (SENEDA et al., 2008) e murinos (SHA et al.,2020). Porém, ao contrário do nosso estudo, Seneda et al. (2008) mostraram que a H3K4me3 foi drasticamente reduzida nas CG suínas, enquanto Sha et al. (2020) observaram que a H3K4me3 aumentou tanto em oócitos como em CG murinas, durante o desenvolvimento folicular. A presença de H3K9me3 foi descrita em oócitos imaturos e CG de FOPAs inclusos em tecido ovariano de babuínos (BAUMMAN et al., 2015), e em oócitos

ISSN: 2447-6161

imaturos de folículos antrais ovinos (HOU et al., 2008). Além disso, Russo et al. (2013) mostraram um nível estacionário de H3K9me3 em oócitos imaturos durante a transição de grandes folículos pré-antrais a antrais, o que corrobora com nossos achados.

CONCLUSÕES

Em conclusão, o PM (H3K4me3) foi alterado durante a formação do antro in vitro (transição de FOPA para FOA - foliculogênese *in vitro*). Interessantemente, o anetol aumentou os níveis de H3K4me3 nas CG e oócitos de FOAs crescidos *in vitro* em relação ao tratamento controle, bem como nos FOPAs e FOAs iniciais crescidos in vivo. Considerando que a H3K4me3 está relacionada com a ativação da expressão de genes chave relacionados a foliculogênese, esta modulação epigenética diferenciada do anetol poderia contribuir para a produção de oócitos de boa qualidade, melhorando, por conseguinte, o cultivo *in vitro* folicular.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq por proporcionar subsídios para a realização com consentimento da bolsa. À Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira (UNILAB), à Universidade Estadual do Ceará (UECE) e ao Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-Antrais (LAMOFOPA) da UECE, pelo apoio no desenvolvimento dos experimentos desta pesquisa

REFERÊNCIAS

BAUMANN, C.; OLSON. M.; WANG, K.; FAZLEABAS, A.; DE LA FUERTE, R. Arginine methyltransferases mediate an epigenetic ovarian response to endometriosis. Reproduction, 150(4), 297-310. 2015.

CHAVES, R. N.; MARTINS, F. S.; SARAIVA, M. V. A.; CELESTINO, J. J. H.; LOPES, C. A. P.; CORREIA, J. C.; VERDE, I. B. L.; MATOS, M. H. T.; BÁO, S. N.; NAME, K. P. O.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured *in vitro*. Reproduction, Fertility and Development, v. 20, n. 5, p. 640–647, 2008.

FIGUEIREDO, J. R.; CADENAS, J.; LIMA, L. F.; SANTOS, R. R. Advances in *in vitro* folliculogenesis in domestic ruminants. Animal Reproduction, v. 16, p. 52-65, 2019.

HOU, J.; LIU, L.; ZHANG, J.; CUI, X. H.; YAN, F. X.; GUAN, H.; CHEN, Y. F.; AN, X. R. Epigenetic modification of histone 3 at lysine 9 in sheep zygotes and its relationship with DNA methylation. BMC Dev Biol. 8:60. 2008.

LIU, Z.; ZHANG, G.; DENG, M.; YANG, H.; PANG, J.; CAI, Y.; WAN, Y.; WANG, F. Inhibition of lysine-specific histone demethylase 1A results in meiotic aberration during oocyte maturation *in vitro* in goats. Theriogenology, v. 143, p. 168-178, 2020.

MAGALHÃES, D. M.; DUARTE, A. B. G.; ARAÚJO, V. R.; BRITO, I. R.; SOARES, T. G.; LIMA, I. M. T.; LOPES, C. A. P.; CAMPELLO, C. C.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. *In vitro* production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. Theriogenology, v. 75, n. 1, p. 182–188, 2011.

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, p. 226–234, 2017.

ISSN: 2447-6161

RUSSO, V.; BERNABÓ, N.; DI GIANCINTO, O.; MARTELLI, A.; MAURO, A.; BERARDINELLI, P.; CURINI, V.; NARDINOCCHI, V.; MATTIOLI, M.; BARBONI, B. H3K9 Trimethylation Precedes DNA Methylation during Sheep Oogenesis: HDAC1, SUV39H1, G9a, HP1, and Dnmts Are Involved in These Epigenetic Events. Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 61(1):75-89. 2013.

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.

SAEEDABADI, S.; ABAZARI-KIA, A. A.; RAJABI, H.; PARIVAR, K.; SALEHI, M .Melatonin improves the developmental competence of goat oocytes. International journal of fertility & sterility, v. 12, n. 2, p. 157, 2018.

SENEDA, M. M.; GODMANN, M.; MURPHY, B. D.; KIMMINS, S.; BORDIGNON, V. Developmental regulation of histone H3 methylation at lysine 4 in the porcine ovary. Reproduction, v. 135, n. 6, p. 829-838, 2008.

SHA, Q. Q.; JIANG, Y.; YU, C.; XIANG, Y.; DAI, X. X.; JIANG, J. C. CFP1-dependent histone H3K4 trimethylation in murine oocytes facilitates ovarian follicle recruitment and ovulation in a cell-nonautonomous manner. Cellular and Molecular Life Sciences, v. 77, p. 2997-2012, 2020.

SILVA, R. F.; LIMA, L. F.; ROCHA, R. M. P.; BRITO, I. R.; SILVA, G. M.; CORREIA, H. H. V.; RODRIGUES, G. Q.; FERREIRA, A. C. A.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S.; MOURA, A. A. A. N.; SILVEIRA, L. B. R.; LO TURCO, E. G.; WHEELER, M. B.; RODRIGUES, A. P. R.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. *In vitro* long-term culture of isolated ovine preantral follicles: Influence of ethanol on steroid production, oocyte meiotic resumption, and metabolomic profile.. Research in veterinary science , v. 135, p. 432-441, 2021.

SOUZA-CÁCERES, M. B.; DE ANDRADE MELO-STERZA, F. Metilação de histonas em oócitos e embriões mamíferos. R. bras. Reprod. Anim. , p. 620-627, 2017.

YU, X. X.; LIU, Y. H.; LIU, X. M.; WANG, P. C.; LIU, S.; MIAO, J. K.; DU, Z. Q.; YANG, C. X. Ascorbic acid induces global epigenetic reprogramming to promote meiotic maturation and developmental competence of porcine oocytes. Scientific Reports, v. 8, n. 1, p. 6132, 2018.

ISSN: 2447-6161