EFEITO DA UTILIZAÇÃO DO ANTIOXIDANTE ANETOL SOBRE A MATURAÇÃO OOCITÁRIA E SUBSEQUENTE PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES CAPRINOS

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

RESUMO

O objetivo deste estudo consistiu em analisar o efeito da adição do antioxidante anetol durante a maturação in vitro (MIV) de oócitos sobre a maturação oocitária e produção de embriões in vitro na espécie caprina. Para tanto, complexos cumulus-oócitos (CCO) oriundos de slincing de ovários frescos foram selecionados e lavados em meio de MIV (TCM-199) suplementado com 17-β-estradiol, LH, rFSH, EGF, BSA, piruvato, IGF-I e cisteamina, denominado TCM 199+. Os CCO foram distribuídos aleatoriamente nos tratamentos: 1) Ausência de anetol (tratamento controle)., e 2) Anetol 300 µg/mL (tratamento AN300). Os oócitos foram maturados em grupo, sob óleo mineral a 38,5 °C e em atmosfera umidificada com 7,5% de CO2 no ar por 24 h. Ao final do experimento, parte dos CCO foram destinados para avaliação da viabilidade e configuração da cromatina, e outra parte destinada para ativação partenogenética, para avaliação do desenvolvimento embrionário. Após MIV, a dosagem dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), avaliação da atividade mitocondrial e dos níveis de EROs mitocondrial foram realizadas nos oócitos de cada tratamento. Os dados foram expressos como média (±EPM) ou percentuais, sendo $P > 0,05$. Os resultados demonstraram que a suplementação do meio de MIV com 300 µg/mL de anetol não promoveu diferenças significativas em relação ao tratamento controle quanto à maturação nuclear ($P > 0,05$). Nesse mesmo sentido, os marcadores de estresse oxidativo avaliados após a MIV não diferiram entre os tratamentos ($P > 0,05$). Por fim, após ativação partenogenética, as taxas de clivagem e produção de embriões foram semelhantes entre os tratamentos ($P > 0,05$). Em conclusão, para a espécie caprina, a suplementação de anetol (300 µg/mL) na MIV não promoveu melhora na maturação oocitária e produção de embriões in vitro.

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, andreconceicao.mv@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, Docente, juliana.celestino@unilab.edu.br[4]

ISSN: 2447-6161

INTRODUÇÃO

A produção in vitro de embriões (PIVE) se destaca como uma biotécnica com potencial para acelerar e maximizar a reprodução e o melhoramento genético, como também no desenvolvimento sustentável na produção de caprinos. Entretanto, apesar dos grandes avanços observados nos últimos anos, esta tecnologia ainda é deficiente, resultando em baixo número de embriões e de má qualidade. A dificuldade em se produzir bons resultados estão correlacionados a vários fatores, incluindo o estresse oxidativo (EO) durante a maturação in vitro (MIV), uma etapa limitante da PIVE.

Como estratégia para otimizar a MIV, a adição de antioxidantes no meio de maturação visa balancear a excessiva produção de EROS. Os antioxidantes são moléculas capazes de inibir a formação, eliminar ou estabilizar os radicais livres, ou ainda atuar no processo de reparo de danos oxidativos (RIBEIRO et al., 2005). Nesse sentido, nos últimos anos diversas substâncias têm mostrado potencial antioxidante na MIV, contudo, ultimamente compostos naturais, como o anetol, têm tido grande destaque por serem advindos de espécies vegetais, facilitando e barateando sua obtenção, e ainda por apresentarem resultados promissores.

O anetol é um metabólito secundário encontrado no óleo essencial de Croton zehntneri (Euphorbiaceae), planta popularmente conhecida por “canela de cunhã”, oriunda do Nordeste brasileiro (SÁ et al., 2017; 2018). Seu potencial em mitigar EROS já foi avaliado em folículos ovarianos cultivados in situ (SÀ et al., 2017) e isolados (SÀ et al., 2018; SÀ et al., 2020) em caprinos, e na MIV de oócitos bovinos (ANJOS et., 2019; SÁ et al., 2019; JANINI et al., 2023), alcançando resultados promissores. Contudo, seu efeito até o momento não foi avaliado 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: (1) taxas de maturação oocitária, (2) níveis de EROs intracelular, (3) potencial de membrana mitocondrial e (4) 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 slincing 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 de anetol (tratamento controle)., e 2) Oócitos maturados na presença de anetol 300 µg/mL (tratamento AN300). 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 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

ISSN: 2447-6161

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 configuração anormal.

Os CCO de todos os tratamentos foram avaliados quanto ao potencial de membrana mitocondrial e produção de EROS mitocondrial. Para tanto, os CCO foram incubados com as sondas fluorescentes MitoTracker ® Orange (potencial de membrana mitocondrial) e H2DCFDA e processados como descrito por Perry et al. (2011) e Fabrri et al., 2014, respectivamente. Após marcação com sondas fluorescentes, os CCO´s foram avaliados através de microscopia confocal. Além disso, o meio de maturação foi coletado para avaliação dos níveis de EROs através do método Amplex Red/HRP (Molecular Probes) que detecta o acúmulo de produtos oxidados fluorescentes no meio da reação.

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 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 $P < 0,05$.

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.

Nos oócitos submetidos à MIV foi observado que, após a incubação com anetol, taxas de oócito em vesícula germinativa, ruptura de vesícula germinativa, metáfase I, metáfase II e oócitos degenerados não apresentaram diferenças significativas ($P>0,05$). De modo geral, após a MIV, o número de oócitos que retomaram a meiose não diferiu ($P>0,05$) (Tabela 1).

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

ISSN: 2447-6161

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. Além disso, Janini et al. (2023) mostraram que 300 µg/mL de anetol não promoveu diferenças na taxa de oócitos em MII, como ainda evidenciou que a concentração de 3000 µg/mL de anetol, 10x superior a utilizada neste estudo, reduziu significativamente a taxa de oócitos em MII. Contudo, além do anetol e assim como os nossos achados, a suplementação da MIV com outros antioxidantes como quercetina, cisteamina, carnitina, vitamina C ou resveratrol não afetou a taxa de oócitos que retomaram a meiose ou que alcançaram o estágio de MII em caprinos (SOVERNIGO et al., 2017). Chowdhury et al. (2018) relataram que a utilização de antioxidante na MIV pareceu não influenciar sobre a maturação nuclear, mas exerceu efeitos benéficos sobre a maturação citoplasmática, que refletiu no desenvolvimento embrionário inicial.

Após a MIV, não foram observadas diferenças entre os tratamentos ($P > 0,05$) em relação aos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênios, potencial de membrana mitocondrial e concentração de peróxido de hidrogênio no meio de maturação.

Em relação aos níveis de espécies reativas de oxigênio, nossos resultados estão de acordo ao encontrado por Sá et al. (2019), em que o anetol, independente da concentração, não exerceu efeito sobre esse parâmetro. Corroborando com isso, foi observado após a PIVE em bovinos, que o anetol não exerceu efeito sobre níveis de malondialdeído (MDA), que é produto da peroxidação lipídica e, consequentemente, marcador de estresse oxidativo (JANINI et al., 2023). Diferentemente dos níveis de EROs, o potencial de membrana mitocondrial foi afetado pelo anetol no trabalho de Sá et al. (2019), nas concentrações de 300 µg/mL e 2000 µg/mL, estando em contraponto ao encontrado no presente estudo. Este contraponto pode estar relacionado à espécie utilizada no estudo, uma vez que o aumento no potencial de membrana observado por Sá et al. (2019) foi relacionado ao aumento no metabolismo celular, entretanto, sem impacto nos níveis de EROs, como observado neste estudo. Apesar disso, em caprinos, o anetol foi capaz de promover a manutenção da viabilidade de folículos pré-antrais (SÁ et al., 2017; SÁ et al., 2018) e antrais (SÁ et al., 2020), tendo impacto positivo sobre o estresse oxidativo.

Em relação às taxas de clivagem e produção de embriões (mórula+blastocistos) após ativação partenogenética e cultivo embrionário, não foram observadas diferenças entre os tratamentos controle e AN300 em ambas as avaliações. Em trabalhos na espécie bovina, a adição de 300 µg/mL durante a MIV promoveu aumento nas taxas de clivagem e produção de embriões (SÁ et al., 2019; ANJOS et al., 2019; JANINI et al., 2023), diferentemente do observado em nossos resultados, cabendo ressaltar, contudo, que nesses estudos foi utilizada a espécie bovina como modelo experimental. Apesar disso, nossos achados relacionados à taxa de produção de embriões são superiores quando comparados a estudos que utilizaram crocentina (MENÉNDEZ-BLANCO et al., 2020) ou ácido alpha-lipóico (HE et al., 2021), durante a MIV de oócitos caprinos.

CONCLUSÕES

Em conclusão, apesar da suplementação do meio de maturação in vitro com a concentração de anetol 300 µg/mL ser recomendada na literatura para a espécie bovina, em caprinos, este estudo demonstrou que essa mesma concentração não foi eficaz em promover diferenças significativas em nenhum dos parâmetros avaliados. Apesar disso, ressalta-se a importância da necessidade de se avaliar outras concentrações de anetol na MIV de oócitos caprinos a fim de se definir a concentração mais adequada para promoção da

ISSN: 2447-6161

maturação oocitária e produção de embriões na espécie.

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 01/09/2022 e 31/08/2023, 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.

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.

CHOWDHURY, M. M. R.; MESALAM, A.; KHAN,I.; JOO, M. D.; LEE, K. L.; XU, L.; AFRIN, F.; KONG, I. K .Improved developmental competence in embryos treated with lycopene during in vitro culture system. Molecular Reproduction and Development, v. 85, n. 1, p. 46-61, 2018.

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.

FABBRI, R.; VICENTI, R.; MARTINO, N. A.; DELL’AQUILA, N. E.; PASQUINELLI, G.; MACCIOCCA, M.; MAGNANI, V.; PARADISI, R.; VENTUROLI, S. Confocal laser scanning microscopy analysis of bioenergetic potential and oxidative stress in fresh and frozen-thawed human ovarian tissue from oncologic patients. Fertility and Sterility, v. 101, n. 3, p. 795-804. e1, 2014.

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.

PERRY, S. W.; NORMAN, J. P.; BARBIERI, J.; BROWN, E. B.; GELBARD, H. A. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. Biotechniques, v. 50, n. 2, p. 98-115, 2011.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; PELUZIO, M. D. C. G.; COSTA, N. M. B.; DA MATTA, S. L. P.; QUEIROZ, M. E. L. R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. Bioscience Journal, v.21, p.133-149, 2005.

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-CARDOSO, J. H.;GASTAL, E. L.; FIGUEIREDO, J. R. Anethole reduces oxidative stress and improves in vitro survival and activation of

ISSN: 2447-6161

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.

ISSN: 2447-6161