AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NA MATURAÇÃO IN VITRO DE OÓCITOS CAPRINOS: EFEITOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANETOL

Kéthelly Rocha Uchôa [1]
Alessandro Silva Ferreira [2]
André Luiz Da Conceição Santos[3]
José Ricardo De Figueiredo[4]
Juliana Jales De Hollanda Celestino[5]

RESUMO

O presente estudo objetivou analisar o efeito da adição de diferentes concentrações do antioxidante anetol durante a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos, sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e atividade mitocondrial. Complexos cumulus-oócitos (CCO) oriundos de *splicing* 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+. Para avaliar o efeito do anetol adicionado ao meio de MIV, os CCO foram distribuídos aleatoriamente nos tratamentos: 1) Oócitos maturados *in* vitro sem anetol (controle)., 2) Oócitos maturados *in* vitro com anetol 30 µg/mL (AN30)., 3) com anetol 300 µg/mL (AN300) e 4) com anetol 2000 µg/mL (AN2000). Ao final, o meio e parte dos CCO foi destinada para avaliar os níveis de EROs no meio, mitocondrial nos oócitos e o potencial de membrana mitocondrial. Observou-se que o anetol a 2000 µg/mL aumentou o potencial da membrana mitocondrial quando comparado aos outros tratamentos ($P < 0,05$). Os níveis de EROs intracelular e o conteúdo de H_2O_2 no meio de MIV não foram influenciados pelo anetol ($P>0,05$) Em conclusão, a concentração de 2000 µg/mL de anetol aumentou o potencial de membrana mitocondrial oocitário, contudo, sem haver relação com aumento do estresse oxidativo.

Palavras-chave: Maturação oocitária; Anetol; Estresse Oxidativo.

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira - UNILAB, Auroras, Discente, kethelly_rocha@hotmail.com.br[1]
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira - Unilab, Auroras, Discente, silvaalesandro90@gmail.com[2]
Universidade Estadual do Ceará - Uece, Laboratório de Manipulação de Ovócitos e Folículos Pré-antrais, Discente, andreconceicao.mv@gmail.com[3]
Universidade Estadual do Ceará - Uece, Laboratório de Manipulação de Ovócitos e Folículos Pré-antrais, Docente, figueiredolamofopa@gmail.com[4]
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira - Unilab, Auroras, Docente, juliana.celestino@unilab.edu.br[5]

ISSN: 2447-6161

INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotecnologia utilizada como estratégia para acelerar o ganho genético e melhorar a eficiência reprodutiva de rebanhos caprinos (Belletti, 2013). A PIVE engloba as etapas de maturação (MIV), fertilização (FIV) e cultivo embrionário *in vitro* (CIVE). No ambiente *in vitro*, as condições de cultivo como: temperatura, luz, pH, constituintes do meio, concentração de oxigênio e o tempo de manipulação podem acarretar a formação excessiva de espécies reativas de oxigênio, ocasionando estresse oxidativo (EO) (Corrêa et al., 2008; Menezo et al., 2016). O EO ocorre quando há um desbalanço entre fatores pró-oxidantes, como as espécies reativas de oxigênio (EROs), e a defesa antioxidante celular. A PIVE é prejudicada pelo EO, uma vez que as EROs possuem a capacidade de interagir com os constituintes celulares e assim resultar em alterações moleculares em ácidos nucleicos, proteínas e lipídios, alterações mitocondriais, apoptose e falhas na maturação e/ou desenvolvimento embrionário (Corrêa et al., 2008; Menezo et al., 2016).

A suplementação de antioxidantes na MIV têm sido uma estratégia para redução dos efeitos deletérios do EO *in vitro*. Os antioxidantes são moléculas capazes de inibir a formação de radicais livres, estabilizar os radicais, ou ainda, atuar no processo de reparo de danos oxidativos (Ribeiro et al., 2005). Dentre as moléculas com capacidade antioxidante já estudadas na MIV, o anetol, metabólito secundário encontrado no óleo essencial de *Croton zehntneri* (Euphorbiaceae), vem apresentando resultados promissores, principalmente na MIV de oócitos bovinos Sá et al. (2019). Contudo, seu efeito até o momento não foi avaliado em adição ao meio de maturação *in vitro* caprina, em diferentes concentrações. Assim, o presente trabalho objetivou analisar o efeito da adição de diferentes concentrações do antioxidante anetol durante a maturação i*n vitro* (MIV) de oócitos caprinos, sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e atividade mitocondrial.

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 2h 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) ausência de anetol (tratamento controle)., 2) a presença de anetol 30 µg/mL (tratamento AN30)., 3) presença de anetol 300 µg/mL (tratamento AN300)., e 4) presença de anetol 2000 µg/mL (tratamento AN2000). Os COC 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

ISSN: 2447-6161

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 cisteamina (CADENAS et al., 2017), denominado como TCM199+. O experimento foi replicado cinco vezes e 30 oócitos foram usados por tratamento. Após a MIV, COC 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 COC foram avaliados através de microscopia confocal. 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.

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. 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

Para avaliar os efeitos do anetol sobre parâmetros de estresse oxidativo após suplementação durante a MIV de oócitos caprinos, foram investigados marcadores importantes de estresse oxidativo, tanto intracelular quanto no meio de maturação coletado. Após a MIV, o potencial de membrana mitocondrial (Figura 1A) foi maior em AN2000 em relação aos demais tratamentos ($P<0,05$). Além disso, o potencial foi semelhante entre os tratamentos controle, AN30 e AN300 ($P>0,05$). Ainda, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos ($P<0,05$) em relação aos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênios (Figura 1B) e concentração de peróxido de hidrogênio (Figura 1C) no meio de maturação.

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.

As propriedades antioxidantes do anetol foram demonstradas em estudos anteriores (Sá et al., 2017; Sá et al., 2018; Sá et al., 2019; Sá et al., 2020; e Janini et al., 2023). Apesar disso, estes trabalhos denotam que os efeitos benéficos do anetol variam a depender da concentração e da espécie em estudo. De fato, no presente estudo, a adição de anetol potencializou a maturação oocitária e as taxas de produção de embriões. Apesar de não modificar os níveis de alguns marcadores de estresse oxidativo, ou seja, níveis de EROS intracelulares

ISSN: 2447-6161

e concentração de peróxido de hidrogênio no meio de cultivo após MIV, 2000 µg/mL de anetol (AN2000) aumentou a atividade mitocondrial do oócito quando comparada aos outros tratamentos. Resultados semelhantes foram relatados por Sá et al. (2019) e por Janini et al. (2023), em que o anetol não influenciou os níveis de EROS e malondialdeído (MDA) no meio de MIV ou de cultivo embrionário, respectivamente.

Assim, infere-se que o aumento da atividade mitocondrial, induzido pelo anetol, indica o aumento do metabolismo celular não relacionado ao desequilíbrio redox. Corroborando com isso, já foi evidenciado que o aumento moderado da atividade metabólica pode ser benéfico, uma vez que este pode desencadear a retomada da meiose e estimular a extrusão do primeiro corpúsculo polar (Pandey et al., 2010). É relatado na literatura que um dos mecanismos antioxidantes do anetol se dá por meio do aumento da capacidade antioxidante celular, principalmente aumentando a atividade de enzimas antioxidantes. Giustarini et al. (2020) relataram que a atividade das enzimas glutationa (GSH) e superóxido dismutase (SOD) aumentaram na presença de anetol. Além disso, a atividade da catalase (CAT) também foi estimulada pelo anetol (Silva et al., 2024). Em nosso estudo não avaliamos diretamente a atividade da defesa antioxidante intracelular, como as enzimas SOD, CAT e GSH, contudo, hipotetizamos que o anetol possa ter exercido efeitos sobre a atividade dessas enzimas.

CONCLUSÕES

Em suma, é possível concluir que, apesar de não ter sido evidenciada atividade antioxidante neste estudo, o anetol foi capaz de aumentar o potencial de membrana mitocondrial dos oócitos após a MIV, o que pode estar relacionado a melhora na maturação oocitária e na produção *in vitro* de embriões caprinos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (Unilab) pelo financiamento da pesquisa intitulada “Avaliação do estresse oxidativo na maturação in vitro de oócitos caprinos: efeitos de diferentes concentrações de anetol”, executada entre 01/10/2023 a 30/09/2024, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (Pibic).

REFERÊNCIAS

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.

CORRÊA, G. A.; RUMPF, R.; MUNDIM, T. C. D.; FRANCO, M. M.; DODE, M. A. N. Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. **Animal Reproduction Science**, v. 104, n. 4, p. 132-142, 2008.

BELETTI, M. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 2, p. 92-96, 2013.

ISSN: 2447-6161

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.

Giustarini D, Galvagni F, Dalle-Donne I, Milzani A, Lucattelli M, De Cunto G, et al. Anethole dithiolethione increases glutathione in kidney by inhibiting ɣ -glutamyltranspeptidase: biochemical interpretation and pharmacological consequences. **Oxid Med Cell Longev** 2020;2020. https://doi.org/10.1155/2020/ 3562972.

JANINI, L. C. Z.; DELLAQUA, T. T.; MEMBRIVE, C. M. B.; OBA, E.; NICHI, M.; RIZZOTO, G.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. Effects of anethole supplementation on bovine embryo production and quality. **Livestock Science**, v. 274, p. 105262, 2023.

MENEZO Y.J.; SILVESTRIS, E.; DALE, B.; ELDER, K. Oxidative stress and alterations in DNA methylation: two sides of the same coin in reproduction. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 33, n. 6, p. 668-683, 2016.

PANDEY, Ashutosh N. et al. Reactive oxygen and nitrogen species during meiotic resumption from diplotene arrest in mammalian oocytes. **Journal of cellular biochemistry**, v. 111, n. 3, p. 521-528, 2010.

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 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.

SILVA, Felipe F. et al. Croton grewioides essential oil and anethole reduce oxidative stress and improve growth of bovine primordial follicles during culture of ovarian tissue. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, p. rgae093, 2024.

ISSN: 2447-6161

ISSN: 2447-6161