

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 03/11/2023.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ANETOL DURANTE A MIV E CIV NA
MATURAÇÃO OOCITÁRIA E NA PRODUÇÃO E QUALIDADE DE
EMBRIÕES BOVINOS**

LUDIMILA CARDOSO ZOCCAL JANINI

**BOTUCATU – SÃO PAULO
NOVEMBRO/2021**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ANETOL DURANTE A MIV E CIV NA
MATURAÇÃO OOCITÁRIA E NA PRODUÇÃO E QUALIDADE DE
EMBRIÕES BOVINOS**

LUDIMILA CARDOSO ZOCCAL JANINI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, *Campus* de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Animal

Orientador: Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim

BOTUCATU – SÃO PAULO
NOVEMBRO/2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCN. AQUIS TRATAMENTODA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUSDE BOTUCATU – UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Janini, Ludmila Cardoso Zoccal.

Efeitos da suplementação com Anetol durante a MIV e CIVna
maturação oocitária e na produção e qualidade de
embriões bovinos / Ludmila Cardoso Zoccal Janini. -Botucatu,
2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de MedicinaVeterinária e
Zootecnia

Orientador: Fernanda da Cruz LandimCapes:
50504002

1. Bovino - Reprodução. 2. Técnicas de maturação invitro de
oócitos. 3. Desenvolvimento embrionário. 4. Estresse oxidativo.

LUDIMILA CARDOSO ZOCCAL JANINI

**Título: EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ANETOL DURANTE A MIV E
CIV NA MATURAÇÃO OOCITÁRIA E NA PRODUÇÃO E QUALIDADE DE
EMBRIÕES BOVINOS**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Fernanda da Cruz Landim

Orientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ - UNESP
- Botucatu /SP

Prof. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive

Membro

Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - FCAT / UNESP - Campus de
Dracena/SP

Dr. Mateus José Sudano

Membro

Universidade Federal de São Carlos – Ufscar – São Carlos/SP

Data da defesa: 03/11/2021

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **Tânia e Sérgio**, por sempre acreditarem em mim e por terem abdicado de suas vidas em prol das realizações e da felicidade de seus filhos.*

*Ao meu marido **Helitom**, por todo amor, incentivo, apoio, compreensão, por ter abdicado de sua rotina, para a realização desse grande sonho.*

*A minha vó **Irenil**, por todo amor, carinho, preocupação que sempre dedicou a mim.*

*Ao meu irmão **Sérgio**, minha cunhada **Franccis**, e meu sobrinho **Carlos Eduardo**, pela preocupação, carinho e incentivo.*

*Ao meu avô **Juracy** (in memoriam), que sempre foi meu espelho de vida, honestidade, garra e determinação.*

Nada disso teria sentido se vocês não existissem na minha vida.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela dádiva da vida e por me permitir realizar tantos sonhos nesta existência. Obrigada por me permitir errar, aprender e crescer, por sua eterna compreensão e tolerância, por seu infinito amor, pela Sua voz “invisível” que não me permitiu desistir e principalmente por ter me dado uma família tão especial, amigos, enfim, obrigado por tudo!

À **Profª. Fernanda**, pela orientação, pelo incentivo e pela oportunidade de tornar real esse sonho.

Aos membros da banca examinadora, **Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive** e **Dra Raquel Zanetti Puelker**, que tão gentilmente aceitaram participar e colaborar com esta dissertação.

À minha amiga **Thaisy Tino Dellaqua**, pela preocupação e apoio constantes. Toda sua ajuda, conselhos foram fundamentais para a realização deste sonho. A todos os demais amigos e amigas do HV, obrigada pelo convívio, amizade e apoio demonstrado.

Viviane Maria Codognoto, Juliana de Oliveira Bernardo, Bruna Aparecida dos Santos, Guilherme Rizzoto e Edjalma da Silva Rodrigues Junior, por todo apoio, conselho, ajuda durante este mestrado.

À minha **mãe** e ao meu **pai** deixo um agradecimento especial, por todas as lições de amor, companheirismo, amizade, caridade, dedicação, abnegação, compreensão e perdão que vocês me dão a cada novo dia. Sinto-me orgulhoso e privilegiado por ter pais tão especiais. E ao meu **irmão**, sempre pronto a me apoiar em tudo nesta vida.

Ao meu marido **Helitom**, por todo amor, carinho, compreensão e apoio em tantos momentos difíceis desta caminhada. Obrigado por permanecer ao meu lado, mesmo sem os carinhos rotineiros, sem a atenção devida e depois de tantos momentos de lazer perdidos. Obrigado pelo presente de cada dia, pelo seu sorriso e por saber me fazer feliz.

A minha vó **Irenil**, por tanto amor e carinho dedicado a mim nessa vida toda.

Ao meu sobrinho **Carlos Eduardo**, por todo amor incondicional que você sempre me deu. Inúmeras foram as vezes que, me peguei vendo um vídeo ou foto sua chorando pela distância e ausência devido as atividades do mestrado, sou muito feliz por você fazer parte da minha vida. A sua existência é o reflexo mais perfeito da existência de Deus.

A minha cunhada **Francis**, que foi a irmã que Deus me enviou e realizou mais um sonho de ter uma irmã, mesmo que não fosse de sangue, mas de alma.

Ao professor Dr. **José Buratini**, por abrir as portas do seu laboratório e me receber para a realização dos experimentos.

Aos funcionários da FMVZ, Edilson, Felipe, Edivaldo, Evandro, as funcionárias da limpeza, por todo apoio durante meu mestrado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento.

*E o futuro é uma astronave que tentamos pilotar, não
tem tempo nem piedade, nem tem hora de chegar.
Sem pedir licença muda a nossa vida, depois convida a
rir ou chorar.*

*Nessa estrada não nos cabe conhecer ou ver o que
virá. O fim dela ninguém sabe bem ao certo onde vai dar.
Vamos todos numa linda passarela de uma aquarela
que um dia, enfim, descolorirá.*

(Toquinho e Vinícius de Moraes)

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	grau Celsius
AI	anáfase I
AMPc	monofosfato cíclico de adenosina
APC	complexo promotor da anáfase
ATP	adenosina-tri-fosfato
ATPase	adenosina trifosfatase
BMP15	proteína morfogênica óssea 15
CIV	cultivo <i>in vitro</i>
CC	células do <i>cumulus</i>
CDK1	quinase dependente da ciclina 1
CDC25	enzima responsável por ativar o fator promotor da maturação
CDC20/FZR1	proteína do ciclo de divisão celular 20
CDX2	expresso no trofectoderma de embriões
CCO	complexo <i>cumulus</i> -oócito
CAT	catalase
CO ₂	dióxido de carbono
CP	corpúsculo polar
DNA	ácido desoxirribonucleico
EROS	espécie reativa de oxigênio
EGFR	receptor do fator de crescimento epidermal
EOMES	gene envolvido na formação do trofectoderma
EGF	fator de crescimento epidermal
EPM	erro padrão da média
FGF	fator de crescimento de fibroblastos
FSH	hormônio folículo estimulante
FIV	fecundação <i>in vitro</i>
FSO	fatores secretados pelo oócito
GDF9	fator de crescimento e diferenciação 9
GMPc	monofosfato cíclico de guanosina
GATA3	fator transcricional GATA 3
GVBD	quebra da vesícula germinativa
GPX	glutaciona peroxidase
GSH	glutaciona
GR	glutaciona redutase
GJ	junções comunicantes do tipo “gap”
GV	vesícula germinativa
H ₂ O	água
K ⁺	potássio
LH	hormônio luteinizante
MIV	maturação <i>in vitro</i>
MPF	fator promotor da maturação
MI	metáfase I
MII	metáfase II
MAPK	proteína quinase ativada por mitógeno
MTOC	centros organizadores dos microtúbulos
mm	milímetros

MCI	massa celular interna
mL	mililitros
µg	micrograma
µl	microlitro
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
NF	fator neurotrópico
NPPC	peptídeo natriurético tipo C
Na ⁺	sódio
NANOG	fator transcricional envolvido na massa celular interna
N ₂	nitrogênio
OMI	fator inibidor da maturação
OCT4	marcador de célula-tronco
O ₂	oxigênio
PIV	produção in vitro de embriões
PKA	proteína quinase A
PBS	tampão fosfato-salina
PRX	peroxirredoxinas
RNA	ácido ribonucleico
SOX2	fator de transcrição que se liga ao RNA
SOD	superóxido dismutase
SFB	soro fetal bovino
TE	trofotoderma
TEAD4	fator de transcrição de domínio TEA 4
TI	telófase I
TGFα	fator de crescimento transformante-α

LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO I

- Figura 1 – Esquema representativo da parada meiótica. A parada meiótica é controlada pelo GMPc e AMPc. A concentração intracelular do GMPc aumenta nas células do cumulus e da granulosa através do estímulo do NPR2, que por sua vez é ativado pelo NPPC. A manutenção dos níveis de AMPc intraocitária provoca a inibição da lise da vesícula germinativa (GVBD), este evento ocorre logo após a passagem do GMPc, através das junções “gap” até o oócito, impedindo que a PDE3A transforme o AMPc em 5’AMP 6
- Figura 2 – Esquema representativo da retomada meiótica. A produção de GMPc nas células murais da granulosa é reduzida devido a uma sequência de eventos in vivo, no qual o LHR, ativado durante o pico do hormônio luteinizante, irá desencadear a desfosforilação do NPR2, inativando-o. O NPR2 está diretamente ligado à redução do GMPc. As células murais e células do cumulus possuem receptores EGFR, os quais são ativados e, ao se unirem ao EGF-like, provocam sua autofosforilação, ativando a via ERK1/2. Esta via por sua vez, induzem a liberação de prostaglandinas e expressão de EGF-like, amplificando sua ativação nas células murais e células do cumulus, impedindo o transporte de GMPc e AMPc intraocitário com o fechamento das junções “gap”. In vitro, a expressão do EGF-like ocorre pela ativação do FSRH pelo FSH. Para a retomada da meiose, é necessário a lise da vesícula germinativa que irá ocorrer pelos eventos citados acima, bem como pela síntese de AMPc nos oócitos. O MPF será ativado para fosforilar proteínas do envoltório nuclear, através a hidrólise do AMPc em 5’-AMP pela PDE3A, que irá prejudicar a atividade da PKA. A via SMAD2/3 irá regular o metabolismo celular, desencadear o processo de luteinização, síntese esteroidal e expressão gênica para expansão do cumulus..... 7
- Figura 3 – Estrutura química do Anetol. A figura acima descreve a estrutura química do Anetol existe como isômeros cis e trans, envolvendo a ligação dupla fora do anel. Mas o isômero abundante, e o preferido para uso, é o isômero trans ou E. O anetol (trans-1-metoxi-4-(1-propenil)-benzeno) é o principal componente do óleo de erva-doce e cânfora mas também pode ser obtido da *Croton zehntneri* Pax et Hoffm, uma planta subarborescente e caducifolia nativa do Nordeste brasileiro, conhecida popularmente como “canelinha” ou “canela de cunhã” 19

LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO II

- Figura 1 – Delineamento experimental para investigar os efeitos da adição do anetol no meio MIV. Os folículos de ovários provenientes de frigorífico foram aspirados e os CCOs foram selecionados e maturados durante 24 horas em meio suplementado com 0 (MC), 300 (M300) ou 3000 (M3000) µg/ml de anetol. Foram realizadas cinco réplicas com 20-25 oócitos por grupo em cada replicata. Os oócitos foram desnudos mecanicamente e a configuração da cromatina foi avaliada após coloração com Hoechst. As células do *cumulus* foram destinadas à análise de RT-qPCR. CCOs: complexos *cumulus*-oócitos; GV: vesícula germinativa; GVBD: ruptura da vesícula germinativa; MI: metáfase I; MII: metáfase II; DEG: degenerado..... 37
- Figura 2 – **Figura.2.** Delineamento experimental para investigar os efeitos da adição do anetol durante a MIV e CIV. CCOs foram maturados em meio suplementado de 0 (MC) ou 300 µg/ml de anetol (M300). Após 24 horas de maturação, os CCOs foram fertilizados e cultivados em 4 grupos distintos, sendo: MC-CC (meios MIV e CIV sem adição de anetol); MC-C300 (meio MIV sem anetol e meio CIV com 300 µg/ml de anetol); M300-CC (meio MIV com 300 µg/ml de anetol e meio CIV sem anetol); M300-C300 (meios MIV e CIV com 300 µg/ml de anetol. No D3 foi avaliada a taxa de clivagem e no D8, a taxa de blastocistos. Assim, os embriões foram destinados a contagem do número total de células embrionárias e pools de 3 blastocistos expandidos (BX) de cada grupo foram armazenados para a avaliação de RT-qPCR. O meio de cultivo embrionário foi destinado à quantificação dos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)..... 38
- Figura 3 – Efeitos da adição de anetol durante a MIV sobre a maturação nuclear de oócitos bovinos. CCOs foram submetidos a MIV em meio controle (MC) acrescido de 300 (M300) ou 3000 µg/ml (M3000) de anetol durante 24 horas ($P < 0,05$). Os dados estão representados por média \pm EPM de 5 réplicas biológicas com 20-25 oócitos por grupo..... 43
- Figura 4 – Efeitos da adição de anetol durante a MIV e CIV sobre a clivagem embrionária. CCOs foram submetidos a MIV e CIV em meios controles (MC-CC: MIV e CIV sem anetol) acrescidos ou não de 300 µg/ml de anetol (MC-C300: MIV sem anetol e CIV com anetol; M300-CC: MIV com anetol e CIV sem anetol; M300-C300: MIV e CIV com anetol) durante 24 horas maturação e 7 dias de cultivo. Após 72 horas da fertilização, a taxa de clivagem foi avaliada em relação ao total de oócitos ($P < 0,05$). Os dados estão representados por média \pm EPM de 5 réplicas biológicas com 20-25 oócitos por grupo..... 44
- Figura 5 – Efeitos da adição de anetol durante a MIV e CIV sobre a produção embrionária. CCOs foram submetidos a MIV e CIV em meios controles (C-C: MIV e CIV sem anetol) acrescidos ou não de 300 µg/ml de anetol (MC-C300: MIV sem anetol e CIV com

- anetol; M300-CC: MIV com anetol e CIV sem anetol; M300-C300: MIV e CIV com anetol) durante 24 horas maturação e 7 dias de cultivo. Ao final de 7 dias do cultivo (D8), a taxa de blastocistos foi avaliada em relação ao total de oócitos ($P > 0,05$). Os dados estão representados por média \pm EPM de 5 réplicas biológicas com 20-25 oócitos por grupo44
- Figura 6 – Efeitos da adição de anetol durante a MIV e CIV sobre a qualidade embrionária. CCOs foram submetidos a MIV e CIV em meios controles (MC-CC: MIV e CIV sem anetol) acrescidos ou não de 300 $\mu\text{g/ml}$ de anetol (MC-C300: MIV sem anetol e CIV com anetol; M300-CC: MIV com anetol e CIV sem anetol; M300-C300: MIV e CIV com anetol) durante 24 horas maturação e 7 dias de cultivo. Ao final de 7 dias do cultivo (D8), o número total de células embrionárias foi contato sob microscópio de fluorescência ($P > 0,05$). Os dados estão representados por média \pm EPM de 5 réplicas biológicas com 20-25 oócitos por grupo45
- Figura 7 – Concentração de malondialdeído (MDA) no meio de cultivo ao final de 7 dias de cultivo embrionário (D8), para avaliar estresse oxidativo através da quantificação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Foram coletados os meios de cinco replicadas biológicas e a concentração final de MDA está expresso em $\mu\text{Mol/L}$ ($P > 0,05$)45
- Figura 8 – Efeitos do anetol durante a MIV sobre a expressão de genes envolvidos na maturação oocitária, apoptose e estresse oxidativo em células do *cumulus*. CCOs foram submetidos a MIV em meio controle (MC) acrescidos de 300 (M300) ou 3000 $\mu\text{g/ml}$ (M3000) de anetol durante 24 horas. Os dados representam a alteração nos níveis de expressão dos genes alvos em relação aos genes de referência (CYCA e GAPDH) de cinco pools para cada grupo. Médias com letras diferentes nas barras representam diferenças estatísticas ($P < 0,05$)46-47
- Figura 9 – Efeitos do anetol durante a MIV e CIV sobre a expressão de genes envolvidos na qualidade embrionária, apoptose e estresse oxidativo em blastocistos. CCOs foram submetidos a MIV e CIV em meios controles (MC-CC: MIV e CIV sem anetol) acrescidos ou não de 300 $\mu\text{g/ml}$ de anetol (MC-C300: MIV sem anetol e CIV com anetol; M300-CC: MIV com anetol e CIV sem anetol; M300-C300: MIV e CIV com anetol) durante 24 horas maturação e 7 dias de cultivo. Os dados representam a alteração nos níveis de expressão dos genes alvos em relação aos genes de referência (CYCA e GAPDH) de cinco pools para cada grupo. Médias com letras diferentes nas barras representam diferenças estatísticas ($P < 0,05$)47-48

LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO II

Tabela 1 – Genes analyzed in CCOs (2 reference and 7 target genes).....	41
Tabela 2 – Genes analyzed in Embryos (2 reference and 7 target genes)...	41

RESUMO

JANINI, L. C. Z. **Efeitos da suplementação com anetol durante a MIV e CIV na maturação oocitária e na produção e qualidade de embriões bovinos.** 2021. 57 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2021.

A produção *in vitro* de embriões (PIV) vem apresentando um crescimento significativo, representando 73,7% dos embriões produzidos mundialmente em 2019. Apesar de sua viabilidade comercial, a PIV necessita de aprimoramento para expandir ainda mais seu potencial. Desta forma, o aumento nas taxas de produção e qualidade embrionária proporcionaria ganhos substanciais na pecuária. Objetivou-se avaliar o efeito do anetol na MIV, nas doses de 300 e 3000 µg/mL (Experimento 1) e avaliar o efeito do anetol na MIV e/ou CIV, na dose de 300 µg/mL, na produção e qualidade de embriões bovinos (Experimento 2). Foram coletados ovários provenientes de frigoríficos utilizados nos dois experimentos. Folículos de 2 a 8mm foram puncionados e submetidos à maturação com meio maturação *in vitro* (MIV) suplementado com SFB 10%. No experimento 1, foram divididos em 3 grupos experimentais, sendo o Grupo Controle composto por (meio base); Grupo M300 (meio base suplementado com 300 µg/ml de anetol) e Grupo M3000 (3000 µg/ml). Após a MIV, a maturação nuclear foi avaliada por meio da técnica de análise da configuração da cromatina para obtenção dos resultados de metáfase II. No experimento 2, a MIV foi realizada com meio base (Grupo Controle) ou suplementado com (300 µg/ml de anetol). Posteriormente, os oócitos foram submetidos à fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV), sendo divididos em 04 grupos: Grupo Controle M0-C0 maturados e cultivados em meio sem adição de anetol, Grupo M0-C300 maturados sem anetol e cultivados em meio com 300 µg/ml, Grupo M300-C0 µg/ml maturados com 300 µg/ml de anetol e cultivados sem anetol e o Grupo M300-C300 com meio contendo 300 µg/ml de anetol na maturação e no cultivo. No 3º dia do cultivo (D3), após a FIV foi avaliado a clivagem, no 7º dia após a FIV (D7), foi avaliado a produção de blastocistos e no 8º dia (D8) foi avaliado e classificado os blastocistos por meio de análise morfológica em estereomicroscópico. Como análise estatística foi utilizado a análise de

variância, com on way ANOVA, utilizando o software GraphPad Prism versão 6.0 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA), e testes de Tukey (dados paramétricos). Observou-se que 300 µg/mL de anetol no meio MIV não promoveu diferença nas taxas de MII quando comparado ao grupo controle. Entretanto, a adição de 3000 µg/mL de anetol reduziu significativamente a porcentagem de CCOs que chegaram à metáfase II em relação aos demais grupos ($P \leq 0,05$). Em relação ao índice de clivagem, observamos que a adição de 300 µg/ml de anetol durante a MIV e a CIV aumentou a porcentagem de embriões clivados quando comparado aos demais grupos experimentais ($P \leq 0,05$). Entretanto, nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos quanto a produção embrionária, avaliada pela taxa de formação de blastocistos no D8 ($P > 0,05$), nem sobre a qualidade embrionária, obtida por meio da contagem do número total de células embrionárias ($P > 0,05$). Apesar das evidências dos efeitos antioxidantes do anetol, encontradas na literatura, neste estudo o teste de TBARS realizado no meio de produção de embriões não apresentou significância estatística. Os genes *SOD 1*, *CAT* e *GST* relacionados a resistência ao estresse oxidativo, apresentaram aumento em sua abundância nas células da granulosa quando foi utilizado o anetol. Além disso, os genes *COX2* e *HAS* também se apresentaram elevados, ressaltando o efeito benéfico do anetol sobre o metabolismo das CCs. Os embriões produzidos com ócitos maturados em presença de anetol também apresentaram elevação de transcritos do gene *GPX1* que está envolvido na metabolização do peróxido de hidrogenio. A elevação da abundância destes transcritos demonstra a contribuição do anetol para a neutralização do efeito das EROS. Por outro lado, apesar do alto número de embriões produzido no grupo maturado e cultivado com anetol, os genes *IFNT2* e *HASPA1A* se encontravam diminuídos. Conclui-se que a adição de 300 µg/mL de anetol durante a MIV e a CIV melhora a clivagem embrionária sem comprometer o desenvolvimento posterior do blastocisto.

Palavras-chave: Estresse oxidativo, Espécies Reativas de Oxigênio (EROS), Anetol, PIV, Desenvolvimento Embrionário, Bovino.

ABSTRACT

JANINI, L. C. Z. **Effects of anethole supplementation during IVM and IVC on oocyte maturation and on production and quality of bovine embryos.** 2021. 57 f. Dissertation (Master's Degree) – School of Veterinary Medicine and Animal Science, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2021.

INTRODUCTION: In vitro embryo production (IVP) has shown significant rise, reaching 68.7% of the embryos produced worldwide in 2018. Despite its commercial viability, IVP needs improvement to further expand its potential. Thus, livestock would benefit with substantial gains from increased production rates and embryo quality. **OBJECTIVE:** The objective was to evaluate the effect of anethole on in vitro maturation (IVM) at doses of 300 µg/mL and 3,000 µg/mL (Experiment 1) and to evaluate the effect of anethole on IVM and/or in vitro culture (IVC) at a dose of 300 µg/mL on the production and quality of bovine embryos (Experiment 2). **MATERIAL AND METHODS:** A total of 700 oocytes from ovaries from slaughterhouses were collected to be used in the two experiments. The 2 to 8 mm follicles were punctured and submitted to maturation with IVM medium supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS). In Experiment 1, a total of 300 oocytes were used and divided into 3 experimental groups: the Control Group, composed of basal medium; Group M300 (basal medium supplemented with 300 µg/ml anethole); and Group M3000 (basal medium supplemented with 3,000 µg/ml). After IVM, nuclear maturation was evaluated using chromatin configuration analysis technique to obtain the results of metaphase II (MII) with the best concentration, which was used in Experiment 2. In Experiment 2, IVM was performed either with basal medium only (Control Group) or with supplementation (Group M300 – 300 µg/ml anethole). Subsequently, 400 oocytes were subjected to in vitro fertilization (IVF) and IVC, and then divided into four groups: Control Group M0-C0: matured and cultivated in medium without addition of anethole; Group M0-C300: matured without anethole and cultivated in medium with 300 µg/ml anethole; Group M300-C0: matured with 300 µg/ml anethole and cultivated without anethole; and Group M300-C300: matured and cultivated in medium containing 300 µg/ml anethole. On the 3rd day of culture (D3), cleavage was evaluated after IVF; on the 7th day after IVF (D7), blastocyst production was evaluated; and on the 8th day (D8), blastocysts were evaluated and classified

through morphological analysis in a stereomicroscope. Statistical analysis was carried out by using the one-way analysis of variance (one-way ANOVA), as well as Tukey tests for parametric data. RESULTS: When 300 µg/mL anethole were added to the MIV medium, there was no difference in MII rates in comparison to the control group. However, the addition of 3,000 µg/mL anethole significantly reduced the percentage of cumulus-oocyte complex (COC) that reached MII in relation to the other groups ($P \leq 0.05$). Regarding the cleavage index, the addition of 300 µg/ml anethole during IVM and IVC was observed to increase the percentage of cleaved embryos when compared to the other experimental groups ($P \leq 0.05$). Nevertheless, no difference was found between the groups regarding embryo production, which was assessed by blastocyst formation rate on D8 ($P > 0.05$), nor related to embryo quality, which was obtained by counting the total number of embryonic cells ($P > 0.05$). In spite of the evidence of antioxidant effects of anethole pointed out in the literature, the TBARS test performed in this study in the embryo production medium did not show any statistical significance. The SOD1, CAT, and GST genes related to resistance to oxidative stress presented increased abundance in granulosa cells when anethole was used. In addition, the COX2 and HAS genes were also elevated, highlighting the beneficial effect of anethole on the metabolism of COCs. Similar to in embryos produced with cells matured in the presence of anethole, a rise was detected in transcripts of the GPX1 gene, which is involved in the metabolization of hydrogen peroxide. The increased abundance of these transcripts demonstrates the role of anethole in neutralizing the effect of ROS. On the other hand, regardless of the large number of embryos produced in the group matured and cultivated with anethole, the IFNT2 and HASPA1A genes were decreased. CONCLUSION: The addition of 300 µg/mL anethole during IVM and IVC improves embryonic cleavage without compromising blastocyst development.

Keywords: Oxidative stress, Reactive Oxygen Species (ROS), Anethole, IVP, Embryonic Development, Bovine.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	1
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Interação <i>cumulus</i> -oócito	2
2.2 Maturação Oocitária	3
2.1.1 Maturação Nuclear	7
2.1.2 Maturação Citoplasmática	9
2.1.3 Maturação Molecular	11
2.2 Desenvolvimento Embrionário	13
2.3 Espécie Reativa de Oxigênio – pontos positivos e negativos.....	15
2.4 Anetol	18
2.5 Hipótese	21
2.6 Objetivos	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
CAPÍTULO II	33
ARTIGO	33
1. Introdução	34
2. Material de métodos.....	35
2.2 Obtenção dos complexos <i>cumulus</i> -oócitos (CCOs) <i>post mortem</i> e maturação in vitro (MIV).....	36
2.3.1 Delineamento Experimento 1: Efeito da suplementação com anetol durante a maturação oocitária <i>in vitro</i> (MIV)	36
2.3.2 Experimento 2: Efeito da suplementação com anetol durante a maturação <i>in vitro</i> (MIV) e Cultivo <i>in vitro</i> (CIV) sobre a produção embrionária.....	37
2.4 Avaliação da Viabilidade do oócito e configuração da cromatina	39
2.5 Fecundação <i>in vitro</i> (FIV) e Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	39
2.6. Contagem do número de células dos blastocistos	40
2.8. Quantificação dos níveis de estresse oxidativo.....	42
2.9. Análise Estatística	43
3. Resultados	43
4. Discussão.....	48

5. Conclusão	52
6. Referências	53

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

O nascimento do primeiro bezerro produzido *in vitro* em 1982 (BRACKETT *et al.*, 1982; MELLO *et al.*, 2016) demonstrou as vantagens, de tal biotecnologia, que têm permitido o avanço genético e o crescimento exponencial do rebanho bovino, impactando tanto na produção quanto na agregação de valor no agronegócio brasileiro. Entretanto, os embriões resultantes de produção *in vitro* (PIV) são mais sensíveis ao estresse oxidativo do que aqueles produzidos *in vivo* sendo, portanto, menos tolerantes à criopreservação (CASTRO *et al.*, 2016, SÁ *et al.*, 2017; TORRES-OSORIO *et al.*, 2019).

No processo de produção de embriões, o crescimento e a sobrevivência dos oócitos são influenciados pelo ambiente, pois em situações *in vitro* há maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROS). Estudiosos afirmam que altos níveis de EROS produzidos durante a PIV podem impactar na maturação oocitária, assim como na estrutura molecular e celular dos embriões produzidos. Devido a esse fenômeno, uma gama de antioxidantes tem sido adicionada ao meio de cultivo na tentativa de minimizar tais danos (SÁ *et al.*, 2017; SÁ *et al.*, 2018).

O anetol é o principal produto do óleo essencial extraído da *Croton zehntneri*, planta nativa do nordeste brasileiro capaz de diminuir as concentrações de EROS, não só *in vivo*, mas também *in vitro*, além de apresentar outros benefícios como ações anti-inflamatórias, anestésica e até anticarcinogênica (SÁ *et al.*, 2017; SÁ *et al.*, 2018).

Sá *et al.* (2018) demonstraram que o anetol melhorou o número de oócitos meioticamente competentes para a fertilização após ser adicionado à maturação *in vitro* de folículos caprinos. Recentemente, o uso de anetol durante a MIV e CIV foi testado em bovinos melhorando a atividade mitocondrial dos oócitos e a produção embrionária (SÁ *et al.*, 2019). Porém, até o momento não existem estudos que associem a sua utilização tanto na MIV como na CIV.

Nesse sentido, objetivou-se avaliar o efeito do anetol na MIV, nas doses de 300 e 3000ug/mL (Experimento 1) e avaliar o efeito do anetol na MIV e/ou CIV, na dose de 300ug/mL (Experimento 2). Foram avaliados os parâmetros de produção, qualidade e expressão genica nos embriões produzidos.

6. Referências

- [1] Cavalieri FLB, Morotiti F, Seneda MM, Colombo AHB, Andreazzi MA, Emanuelli IP et al. Improvement of bovine in vitro embryo production by ovarian follicular wave synchronization prior to ovum pick-up. *Theriogenology*. 2018;117:57-60. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.11.026>
- [2] Lonergan P, Fair T. In vitro-produced bovine embryos-dealing with the warts. *Theriogenology*. 2018;69(1):17-22. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.007>
- [3] Bertagnolli AC, Gonçalves PBD, Giometti IC, Costa LFS, Oliveira JFC, Gonçalves IDV et al. Interação entre células do cumulus e atividade da proteína quinase C em diferentes fases da maturação nuclear de oócitos bovinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2004;56:488-496. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352004000400010>
- [4] Van Wagtenonk-de Leeuw AM. Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. *Theriogenology*. 2006;65:914-925. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.007>
- [5] Absalón-Medina VA, Bedford-Guaus SJ, Gilbert RO, Siqueira LC, Esposito G, Schneider et al. The effects of conjugated linoleic acid isomers cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 on in vitro bovine embryo production and cryopreservation. *Journal of Dairy Science*. 2014;97(10): 6164-6176. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7719>
- [6] Sirard MA. The influence of in vitro fertilization and embryo culture on the embryo epigenetic constituents and the possible consequences in the bovine model. *Journal of developmental origins of health and disease*. 2017;8(4):411-417. <https://doi.org/10.1017/S2040174417000125>
- [7] Gilchrist RB. Recent insights into oocyte–follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to in vitro maturation. *Reproduction, Fertility and Development*. 2011;23(1):23-31. <https://doi.org/10.1071/rd10225>
- [8] Combelles CMH, Gupta S, Agarwal A. Could oxidative stress influence the in-vitro maturation of oocytes? *Reproductive biomedicine online*. 2009;18:864-880.
- [9] Murray AA, Swales AK, Smith RE, Molinek MD, Hillier SG, Spears N. Follicular growth and oocyte competence in the in vitro cultured mouse follicle: effects of

gonadotrophins and steroids. MHR-Basic Science of Reproductive Medicine. 2008;14:75-83. <https://doi.org/10.1093/molehr/gam092>

[10] Sá NAR, Araújo VR, Correia HHV, Ferreira ACA, Guerreiro DD, Sampaio AM et al. Anethole improves the in vitro development of isolated caprine secondary follicles. *Theriogenology*. 2017;89:226–234. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.12.014>

[11] Sá NAR, Bruno JB, Guerreiro DD, Cadenas J, Alves BG, Cibin FWS et al. Anethole reduces oxidative stress and improves in vitro survival and activation of primordial follicles. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2018;51:1-8. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20187129>

[12] Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 2000;408:239-247. <https://doi.org/10.1038/35041687>

[13] Wang X, Falcone T, Attaran M, Goldberg JM, Agarwal A, Sharma RK. Vitamin C and Vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. *Fertility and Sterility*. 2002;78:1272-1277. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)04236-X](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)04236-X)

[14] Livingston T, Rich K, MacKenzie S, Godkin JD. Glutathione content and antioxidant enzyme expression of in vivo matured sheep oocytes. *Anim Reprod Sci*. 2009;116:265-273. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.02.004>

[15] Andrade ER, Melo-Sterza FA, Seneda MM, Alfieri AA. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2010;34:79-85. <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v34n2/p79-86.pdf> [acesso em 2021 out 20]

[16] Sá NAR, Vieira LA, Ferreira ACA, Cardenas J, Bruno JB, Maside C et al. Anethole Supplementation During Oocyte Maturation Improves In Vitro Production of Bovine Embryos. *Reproductive Sciences*. 2019;27:1602-1608. <https://doi.org/10.1177/1933719119831783>

[17] Takahashi T, Inaba Y, Somfai T, Kaneda M, Geshi M, Nagai T et al. Supplementation of culture medium with L-carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*. 2013;25:589-599. <https://doi.org/10.1071/rd11262> [acesso em 2021 out 20]

- [18] Crocomo LF, Marques Filho WC, Alvarenga FDCL, Bicudo SD. Produção de embriões in vitro: estresse oxidativo e antioxidantes. *Veterinária e zootecnia*. 2012;470-479. <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/141273>
- [19] Matos DG de, Herrera C, Cortvrindt R, Smitz J, Van Soom A, Nogueira D, Pasqualini RS. Cysteamine supplementation during in vitro maturation and embryo culture: a useful tool for increasing the efficiency of bovine in vitro embryo production. *Molecular Reproduction Development*. 2002;62:203-209. <https://doi.org/10.1002/mrd.10087>
- [20] Khurana NK, Niemann H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Biology of reproduction*. 2000;62:847-856. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.4.847>
- [21] Cadenas J, Maside C, Ferreira ACA, Vieira LA, Leiva-Revilla J, Paes VM et al. Relationship between follicular dynamics and oocyte maturation during in vitro culture as a non-invasive sign of caprine oocyte meiotic competence. *Theriogenology*. 2017;107:95-103. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.10.038>
- [22] Robert I, Nelson RE. Certification and identification of the embryo. In: Stringfellow D, Seidel SM (Ed.) *Manual of the International Embryo Transfer Society*. Savoy: IETS; 1998. pp.103-134.
- [23] Jakobsen AS, Thomsen PD, Avery B. Few polyploid blastomeres in morphologically superior bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology*; 2006;65(4):870-881.
- [24] Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RHL, Moorman AFM. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience letters*. 2003;339(1):62-66.
- [25] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*. 2001;29(9):e45-e45.
- [26] Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. In: Buege JA, Aust SD. *Methods in enzymology*. Academic press; 1978. pp. 302-310.
- [27] Chankitisakul, V., Somfai, T., Inaba, Y., Techakumphu, M., Nagai, T. Supplementation of maturation medium with L-carnitine improves cryo-tolerance of bovine in vitro matured oocytes. *Theriogenology*.2013;79:590-598. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.11.011>
- [28] Furnus CC, De Matos DG, Picco S, García PP, Inda AM, Mattioli G et al. Metabolic requirements associated with GSH synthesis during in vitro maturation of cattle

- oocytes. *Animal reproduction science*. 2008;109:88-99.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.12.003>
- [29] Galicka A, Krętowski R, Nazaruk J, Cechowska-Pasko M. Anethole prevents hydrogen peroxide-induced apoptosis and collagen metabolism alterations in human skin fibroblasts. *Molecular and cellular biochemistry*. 2014;394:217-224.
<https://doi.org/10.1007/s11010-014-2097-0>
- [30] Korkina LG. Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. *Cellular and molecular biology*. 2007;53:15-25.
- [31] Silva JR, Van den Hurk R, Costa SH, Andrade ER, Nunes AP, Ferreira FV et al. Survival and growth of goat primordial follicles after in vitro culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. *Animal reproduction science*. 2004;81:273-286. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.09.006>
- [32] Goto Y, Noda Y, Mori T, Nakano M. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. *Free Radic Biol Med*. 1993;15:69-75.
[https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90126-f](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90126-f)
- [33] Yu Y, Dumollard R, Rossbach A, Lai FA, Swann K. Redistribution of mitochondria leads to bursts of ATP production during spontaneous mouse oocyte maturation. *J Cell Physiol*. 2010;224:672-680. <https://doi.org/10.1002/jcp.22171>
- [34] Richter C, Gogvadze V, Laffranchi R, Schlapbach R, Schweizer M, Suter M et al. Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases. *Biochim Biophys Acta*. 1995;1271:67-74. [https://doi.org/10.1016/0925-4439\(95\)00012-s](https://doi.org/10.1016/0925-4439(95)00012-s)
- [35] Roth Z. Symposium review: Reduction in oocyte developmental competence by stress is associated with alterations in mitochondrial function. *J Dairy Sci*. 2018;101:3642-3654.
<https://doi.org/10.3168/jds.2017-13389>
- [36] Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*. 2012;5:9-19.
<https://doi.org/10.1097/wox.0b013e3182439613>
- [37] Nasr-Esfahani MH, Aitken JR, Johnson MH. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed in vitro or in vivo. *Development*. 1990;109:501-507.
- [38] Noda Y, Matsumoto H, Umaoka Y, Tatsumi K, Kishi J, Mori T. Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. *Mol Reprod Dev*. 1991;28:356-360.
<https://doi.org/10.1002/mrd.1080280408>

- [39] Kala M, Shaikh MV, Nivsarkar M. Equilibrium between anti-oxidants and reactive oxygen species: a requisite for oocyte development and maturation. *Reprod Med Biol.* 2017;16:28-35. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12013>
- [40] Flohe L, Gunzler WA, Ladenstein R. Glutathione and peroxidase. In: Arias I.M., Jakohy W.B. (Eds), *Glutathione: metabolism and function*, Raven Press, New York; 1976, p. 115-138.
- [41] Mutoh H, Hiraishi H, Ota S, Yoshida H, Ivey KJ, Terano A et al. Protective role of intracellular glutathione against ethanol-induced damage in cultured rat gastric mucosal cells. *Gastroenterology.* 1990;98:1452-1459. <https://doi.org/10.5555/uri:pii:001650859091075H>
- [42] Imai H, Nakagawa Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic Biol Med.* 2003;34:145-169. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)01197-8](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)01197-8)
- [43] Santos HS, Furtado E, Rodrigues A, Bandeira P, Lemos T, Bezerra A et al. Chemical composition and antioxidant activity of chemical constituents from *Croton zehntneri* (Euphorbiaceae). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry.* 2017;6(4):1146-1149.
- [44] Souza AAM, Brasil DDSB, Rodrigues CC, Almeida, SMF, Silva NMM, Rêgo JDAR. Avaliação de atividades antioxidantes em plantas do gênero *Croton*. *Brazilian Applied Science Review.* 2020;4(4):2217-2235.
- [45] Sá NA, Ferreira AC, Sousa FG, Duarte AB, Paes, VM, Cadenas J et al. 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.* 2020;87(9):966-977.
- [46] Barbosa KBR, Costa NMB, Alfenas RCG, De Paula SO, Minim VPR, Bressan J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de nutrição.* 2010;23:629-643.
- [47] Rocha-Frigoni NADS, Leão BCS, Nogueira E, Accorsi MF, Mingoti GZ. Reduced levels of intracellular reactive oxygen species and apoptotic status are not correlated with increases in cryotolerance of bovine embryos produced in vitro in the presence of antioxidants. *Reproduction, Fertility and Development.* 2014;26(6): 797-805.
- [48] Yung Y, Ophir L, Yerushalmi GM, Baum M, A Hourvitz, Maman E. HAS2-AS1 is a novel LH/hCG target gene regulating HAS2 expression and enhancing cumulus cells migration. *Journal of ovarian research.* 2019;12(1):1-7.

- [49] Chainy GBN, Manna SK, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Anethole blocks both early and late cellular responses transduced by tumor necrosis factor: effect on NF- κ B, AP-1, JNK, MAPKK and apoptosis. *Oncogene*. 2000;19:2943-2950.
- [50] Dongare V, Kulkarni C, Kondawar M, Magdum C, Haldavnekar V, Arvindekar A. Inhibition of aldose reductase and anti-cataract action of trans-anethole isolated from *Foeniculum vulgare* Mill. fruits. *Food Chemistry*. 2012;132(1):385-390.
- [51] Anjos JC, Aguiar FLN, Sá NAR, Souza JF, Cibin FWS, Alves BG et al. et al. Anethole improves blastocysts rates together with antioxidant capacity when added during bovine embryo culture rather than in the in vitro maturation medium. *Zygote*. 2019;27(6):382-385.