

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 TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.

DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Janini, Ludmila Cardoso Zoccal.

Efeitos da suplementação com Anetol durante a MIV e CIV na 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 Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Fernanda da Cruz Landim

Capes: 50504002

1. Bovino - Reprodução. 2. Técnicas de maturação in vitro de oócitos. 3. Desenvolvimento embrionário.

4. Estresse oxidativo.

Palavras-chave: Anetol; Bovino; Desenvolvimento embrionário; Estresse oxidativo; PIV.

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 trofotoderma 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 trofotoderma
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	glutathione peroxidase
GSH	glutathione
GR	glutathione 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 esteroide 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 grupo..... 44
- 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 grupo..... 45
- 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 <i>in vitro</i> (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.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Interação *cumulus*-oócito

Durante a foliculogênese e a ovogênese, a interação do oócito com as células da granulosa é fundamental, já que estas fornecem os nutrientes necessários para o desenvolvimento do oócito permitindo a aquisição da competência meiótica, crescimento e mudança do metabolismo que caracterizam a maturação oocitária (ABBASSI *et al.*, 2021; CROCOMO; LANDIM-ALVARENGA; BICUDO, 2019). Sendo assim, a presença dessas células durante a maturação *in vitro*, é necessária para a formação de um ambiente bioquímico e metabólico adequado em torno do oócito (RICHANI *et al.*, 2021).

As CCs e o oócito estão interligados por junções comunicantes conhecidas como gap junctions (GJ), localizadas nas projeções transzonais, que são processos citoplásmicos que se estendem das células da corona radiata, a camada mais interna do cumulus, atravessam a zona pelúcida e invadem a membrana plasmática do oócito (ABBASSI *et al.*, 2021; FONTANA *et al.*, 2020).

Essas junções possuem funções mediadas por diversos fatores secretados pelo oócito (FSO) que participam da regulação do desenvolvimento das CCs e do oócito (GILCHRIST; LANE; THOMPSON, 2008), dentre elas, fornecimento de suporte nutricional, transmissão de sinais elétricos e transporte de moléculas mensageiras das células foliculares ao oócito. Dentre os FSO secretados destacam-se GDF9 e BMP15 que, além de participarem da regulação da maturação oocitária, são fundamentais para o desenvolvimento de folículos pré-antrais e antrais por atuarem, juntamente com fator de crescimento de fibroblastos (FGFs), na diferenciação das células da granulosa em CCs (JUENGEL; MCNATTY, 2005; RICHANI *et al.*, 2021). As moléculas mensageiras como AMPc, GMPc e mRNAs que passam através das GJ do oócito para as células do cumulus e vice-versa são responsivas a sinais induzidos por estímulos hormonais (BUCCIONE *et al.*, 1990; HAGHIGHAT; VAN WINKLE, 1990; MACAULAY *et al.*, 2014). Dessa forma, a sinalização de FSO ativa a via SMAD2/3 e estimula tanto a expressão de receptor do fator de crescimento

epidermal (EGFR) como a produção de ácido hialurônico, influenciando a maturação oocitária e também a expansão das CCs (MERAN *et al.*, 2011; SIMPSON *et al.*, 2010).

A interação das CCs com o oócito desempenha um importante papel antes da ovulação, durante o crescimento, desenvolvimento e maturação oocitário. Após a ovulação, apesar das junções entre o oócito e as CCs se romperem, estas células participam dos complexos mecanismos que controlam a interação do espermatozoide com o oócito (ANCIOTO *et al.*, 2004; CAMPOS *et al.*, 2011; LANDIM-ALVARENGA; MAZIERO, 2014; VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Frente ao exposto, fica claro que a presença no oócito de CCs é de suma importância para obter bons resultados na produção *in vitro* de embriões bovinos (PIV) (ANCIOTO *et al.*, 2004; CAMPOS *et al.*, 2011).

Durante o processo chamado de maturação oocitária *in vitro*, a maturação do citoplasma e do núcleo pode ocorrer de forma independente. Oócitos, mesmo que contidos em folículos imaturos, quando removidos do ambiente folicular e cultivados *in vitro*, conseguem retomar o processo meiótico, mas não adquirem capacidade de desenvolvimento, ou competência, reduzindo assim as taxas de produção embrionária (HUANG *et al.*, 1999).

Fatores de crescimento presentes no fluido folicular como o ativina A, inhibina A, fator de crescimento endotelial (VGF), fator neurotrópico (NF), fator de crescimento alfa (TGF- α), entre outros, atuam melhorando a competência oocitária, permitindo a finalização do processo meiótico (CAMPOS *et al.*, 2011). Sendo assim, pode se afirmar que a capacitação dos oócitos para a fertilização irá depender da interação das células do cumulus-oócito e da sincronia que exista entre eles.

A competência dos oócitos também está relacionada a fatores extrínsecos como temperatura, meio de cultivo, efeitos deletérios ambientais e ausência de fatores fisiológicos, o que pode reduzir ainda mais a qualidade dos oócitos maturados *in vitro* (NORRIS *et al.*, 2009; VACCARI *et al.*, 2009).

2.2 Maturação Oocitária

A maturação *in vitro* (MIV) é realizada de maneira artificial, onde um oócito é removido do ambiente folicular, sai do estágio de vesícula germinativa e atinge

a metáfase II e, dessa maneira, os oócitos tornam-se competentes para a fecundação e início da embriogênese (FRANTZ *et al.*, 2006; SMITZ *et al.*, 2004).

O início da meiose é estabelecido ainda na fase fetal, havendo uma parada no início da primeira divisão meiótica, que persiste até a puberdade. A cada ciclo, após o pico do hormônio luteinizante (LH), ocorre o estímulo para retomada da meiose, e esta progride atingindo o estágio de metáfase II no qual o oócito adquire a competência para ser fecundado (BILODEAU-GOESEELS; KASTELIC, 2003).

Ao longo do processo da foliculogênese e oogênese, o crescimento e maturação do oócitos depende da interação entre o oócito e as células do *cumulus oophorus* (RYBSKA *et al.*, 2018). Esta interação é feita através de junções *Gap* que propiciam a comunicação entre as células da granulosa e o oócito conferindo condições para que ocorra a maturação nuclear e citoplasmática (CARABATSOS *et al.*, 2000; DEDIEU *et al.*, 1996). Durante o processo de crescimento folicular e oocitário, qualquer mudança no ambiente folicular irá afetar as etapas de maturação, fecundação e conseqüentemente o desenvolvimento do embrião (TROUNSON; ANDERIESZ; JONES, 2001).

Nos folículos pré ovulatórios, os oócitos bloqueados na fase da prófase I e com seu desenvolvimento completo, estão aptos para retomada da meiose que será estimulada pelo pico pré ovulatório de LH. No entanto, antes que ocorra o estímulo para a retomada da meiose, o fator inibidor da maturação (OMI), um polipeptídeo presente no fluido folicular, sintetizado e secretado pelas células da granulosa, provoca a manutenção do bloqueio da meiose nos oócitos inclusos nos folículos ovarianos (HASHIMOTO *et al.*, 2002; SIRARD; RICHARD; MAYES, 1998).

É conhecido que o segundo mensageiro monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) desempenha um papel crítico na manutenção do bloqueio da meiose, sendo que a presença de altos níveis de Camp, dentro o oócito é essencial para manter o estágio de núcleo dictiado, enquanto que uma queda na concentração intra oocitária de cAMP permite a retomada da meiose (CONTI *et al.*, 2012; SELA-ABRAMOVICH *et al.*, 2006). As células da granulosa desempenham um papel importante na elevação do AMPc em oócitos através da transferência de um inibidor da fosfodiesterase 3 (PDE3), o monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) (ZHANG *et al.*, 2010). O GMPc é produzido pelas células dos cúmulos

através do estímulo de precursores do peptídeo natriurético (NPPC) sintetizados pelas células da granulosa mural (HOLT; LANE; JONES, 2013), e transportado para o oócito através das junções Gap, sustentando assim o bloqueio meiótico (DEKEL, 2005; SELA-ABRAMOVICH *et al.*, 2006).

Os altos níveis de AMPc presentes no oócito suprimem a atividade do fator promotor da maturação (MPF) através de um mecanismo dependente da proteína quinase A (PKA) (BORNSLAEGER; MATTEI; SCHULTZ, 1986; MALLER; KREBS, 1980;). O MPF é uma proteína composta por uma subunidade catalítica, a quinase dependente da ciclina 1 (CDK1) e uma subunidade reguladora, a ciclina B, sendo regulado pela fosforilação de resíduos de treonina 14 e tirosina 15 da CDK1 (BILODEAU-GOESEELS, 2012; DOWNS, 1993; TAIEB; THIBIER; JESSUS, 1997). Esta fosforilação inibitória é catalisada pela kinase Wee1B, enquanto que a desfosforilação é dependente da fosfatase Cdc25 (LEW; KORNBLUTH, 1996).

A inibição da fosfodiesterase 3, causada pelo GMPc, eleva os níveis de cAMP tornando a proteína quinase (PKA) ativa. A PKA regula diretamente a atividade tanto da Wee1B como da Cdc25. Em oócitos bloqueados na prófase meiótica a PKA media a fosforilação da Cdc25 regulando negativamente sua função através de seu sequestro para o citoplasma (PIRINO; WESCOTT; DONOVAN, 2009; ZHANG *et al.*, 2008). Por outro lado, a fosforilação da Wee1 estimula sua ação levando a inibição do MPF.

Em resposta ao LH, a expressão dos receptores para NPPC nas CCs e, conseqüentemente, a transferência de GMPc para o oócito diminui (ROBINSON *et al.*, 2012). Concomitantemente, ocorre a dissolução das junções comunicantes entre o oócito e CC, a qual é mediada por fatores da família do EGF como a epirregulina, ampirregulina e betacelulina (NORRIS *et al.*, 2009; VACCARI *et al.*, 2009). Como resultado da queda do GMPc ocorre um aumento da atividade da PDE3 a qual promove um rápido declínio nos níveis de AMPc no oócito resultando no reinício da meiose (HOLT; LANE; JONES, 2013).

Com a diminuição dos níveis de AMPc a atividade da PKA diminui (Dekel, 2005). Com isso, a Cdc25 é transferida para o núcleo se tornando ativa (OH; HAN; CONTI, 2010). O acúmulo da fosfatase Cdc25 no núcleo promove a ativação do MPF e o transporte da Wee1B para o citoplasma. No momento da

retomada da meiose, a Wee1B é inativada ao mesmo tempo em que a Cdc25 é ativada levando a elevação da atividade da CDK1 (CONTI *et al.*, 2012).

Após a remoção mecânica das células do *cumulus oophorus*, realizado durante o processo de maturação *in vitro*, também ocorre o rompimento das junções Gap, que resulta na diminuição de AMPc intracelular no oócito com consequente retomada da meiose (BILODEAU-GOESEELS, 2003; EYERS *et al.*, 2005).

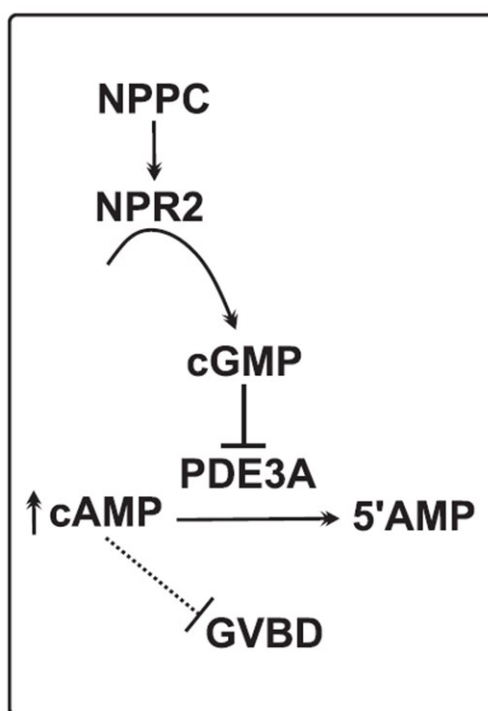


Figura 1. Esquema representativo da parada meiótica. A parada meiótica é controlada pelo GMPc e AMPc. A concentração intracelular do GMPc aumenta nas células do cumulus e da granulosa através do estímulo do NPR2, que por sua vez é ativado pelo NPPC. A manutenção dos níveis de AMPc intraoocitária provoca 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.. Fonte: adaptado de Gilchrist *et al.* (2016).

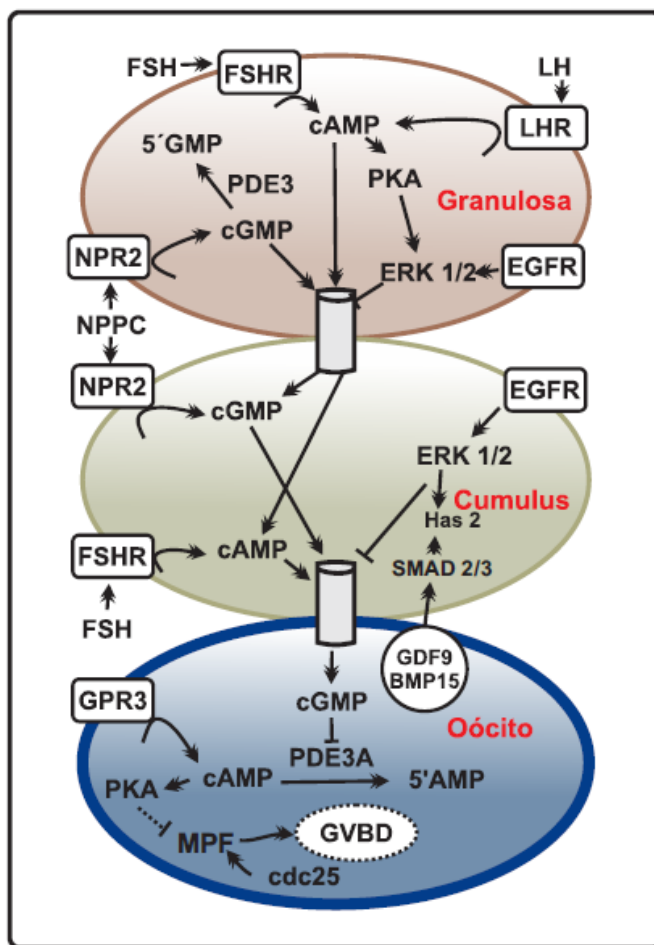


Figura 2. Esquema representativo da retomada meiótica. A produção de GMPc nas células murais da granulosa é reduzida devido a uma sequência de eventos in vivo, no qual o LHR, ativado durante o pico do hormônio luteinizante, irá desencadear a desfosforilação do NPR2, inativando-o. O NPR2 está diretamente 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 intraoocitário 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. Fonte: adaptado de Gilchrist *et al.* (2016).

2.1.1 Maturação Nuclear

Ainda não estão bem elucidados os mecanismos que controlam a maturação nuclear. Observa-se que, quando a meiose é retomada no estágio de diplóteno, ocorre sinalização para condensação cromossômica e quebra da vesícula germinativa (GVBD). Este evento representa a retomada do primeiro bloqueio meiótico, que vai desde o estágio VG até metáfase II (MII) quando se

inicia o segundo bloqueio meiótico. O oócito, após a quebra da vesícula germinativa, passa pelas seguintes fases: metáfase I (MI), Anáfase I (AI) e telófase I (TI), terminando assim a primeira divisão meiótica. O segundo bloqueio irá ocorrer quando o oócito passar pela metáfase II (KUBELKA *et al.*, 2000; SELA-ABRAMOVICH *et al.*, 2006) e a meiose só será finalizada no momento da fecundação.

Na primeira divisão meiótica, no oócito, ocorre uma divisão assimétrica do citoplasma, gerando duas células diferentes: o corpúsculo polar e o oócito secundário. Nesse momento se inicia a segunda divisão meiótica, e o oócito permanece no estágio de MII até que ocorra a fertilização ou ativação partenogenética (QUETGLAS *et al.*, 2010).

Através da observação da configuração dos cromossomos nos diferentes estágios da meiose, podemos classificar o estágio de maturação nuclear dos oócitos. A vesícula germinativa (VG) possui uma cromatina filamentosa e envelope nuclear intacto, com presença de núcleo esférico; quando ocorre a quebra da vesícula germinativa (GVBD), observa-se a ausência de membrana nuclear visível e cromatina condensada. Durante a metáfase I (MI), os cromossomos estão localizados periféricamente no ooplasma, dispostos na placa metafásica, já na metáfase II (MII) os cromossomos migram para a periferia do ooplasma, na qual observa-se a presença da placa metafásica e extrusão do primeiro corpúsculo polar (PB), sendo representado por um grupo compacto de cromossomos (LANDIM-ALVARENGA, 1999).

Proteínas denominadas lamininas, mantém a integridade da membrana nuclear, incluindo a VG. A fosforilação dessas proteínas e a desorganização do envelope nuclear é proporcionado pelo CDK1, durante a quebra da vesícula germinativa (GVBD). Durante a transição da metáfase para anáfase, ocorre a degradação da proteína laminina, sendo controlada pelo complexo promotor da anáfase (APC), o qual é encarregado da ubiquitinação de vários substratos proteicos (SULLIVAN; MORGAN, 2007). O CDC20 ou FZR1 confere especificidade a enzima, sendo que a principal ação da APC é a ligação de um coativador de proteína; sendo que o que permite que a anáfase da mitose ou meiose continue pela degradação da ciclina B1 é a ligação do APC ao CDC20 (JONES, 2011). A condensação dos cromossomos e organização da placa

metafásica ocorrem ao mesmo tempo em que acontece a desintegração do envelope nuclear (ADHIKARI; LIU, 2014).

O fuso da metáfase se organiza para que ocorra a divisão assimétrica do citoplasma, resultando na expulsão do primeiro corpúsculo polar nos oócitos. A diminuição da atividade do MPF ocorre paralelamente a expulsão do PB; mas, logo em seguida sua concentração é aumentada novamente induzindo a organização do fuso metafásico para a segunda divisão meiótica, sem que ocorra descondensação cromossômica, replicação de DNA ou formação do envelope nuclear (LANDIM-ALVARENGA, MAZIERO, 2018).

Para a manutenção dos oócitos em MII, são necessárias altas concentrações de MPF, o qual é estabilizado pela ação da MAPK. A ativação partenogenética ou a fertilização causam uma queda brusca intra-oocitária da MAPK e, conseqüentemente, desestabilização e queda do MPF, o que propicia a finalização da meiose (CHOI *et al.*, 1991; DEDIEU *et al.*, 1996; HASHIMOTO; KISHIMOTO, 1988; JELINKOVA *et al.*, 1994; NAITO; TOYODA, 1991; OH *et al.*, 1998; TAIEB; THIBIER; JESSUS, 1997; WU *et al.*, 1997).

Após a fertilização do oócito, inicia-se a organização do envelope nuclear do pronúcleo feminino com a extrusão do segundo corpúsculo polar (2º PB), separação das cromátides e finalização da meiose. A fusão dos pró-núcleos feminino e masculino ocorre após a extrusão do 2ºPB, marcando assim o início do desenvolvimento embrionário. Durante o processo de maturação e fertilização do oócito são necessárias alterações nucleares para um bom desenvolvimento embrionário, estas alterações são acompanhadas por movimentos de organelas, alterações bioquímicas no citoplasma e movimentos do material genético (VAN BLERKOM, 1991).

2.1.2 Maturação Citoplasmática

As mudanças estruturais e moleculares que acontecem no oócito a partir do estágio de VG até o final da MII, são chamadas de maturação citoplasmática. Podemos avaliar este processo indiretamente, através da capacidade do oócito maduro em clivar e se desenvolver em blastocisto após a ativação partenogenética ou fertilização (LANDIM-ALVARENGA; MAZIERO, 2018).

Diversas mudanças na organização citoplasmática acontecem durante a maturação do oócito, como o rearranjo das mitocôndrias, diminuição do compartimento de Golgi, desenvolvimento contínuo da reserva lipídica e o alinhamento dos grânulos corticais ao longo do oolema. A migração destas organelas leva a mudanças ultraestruturais no citoplasma. Na periferia do oócito estão localizadas as mitocôndrias e o complexo de Golgi, que se movimentam para uma distribuição perinuclear em oócitos imaturos. O complexo de Golgi dá origem aos grânulos corticais, localizados no centro do oócito, os quais se redirecionam para periferia, e ancoram na membrana do oócito, sendo liberados após a fertilização durante o bloqueio a poliespermia (CRAN; MOOR, 1990). A distribuição periférica dos grânulos corticais tem sido utilizada como um critério para avaliar a maturação citoplasmática *in vitro* (BÉZARD, 1997; LANDIM-ALVARENGA; MAZIERO, 2018).

Nos estágios finais da maturação oocitária ocorre um aumento na quantidade de gotículas de lipídios no citoplasma. Este aumento na concentração de grânulos lipídicos representa a reserva energética do oócito para sustentar o desenvolvimento após a fecundação até o estágio de blastocisto (DIELEMAN *et al.*, 2002).

As vias metabólicas oocitárias são ativadas por meio da síntese e fosforilação de proteínas, sendo indispensável para maturação citoplasmática. Durante este processo, as mitocôndrias têm uma função relevante, pois são elementos essenciais ao metabolismo energético. Em períodos definidos do ciclo celular, a transferência das mitocôndrias para áreas de elevado consumo de energia é essencial para oócitos e embriões (KRISHER; BAVISTER, 1998; MEIRELLES *et al.*, 2004).

Durante a maturação do oócito, as mitocôndrias sintetizam a adenosina-trifosfato (ATP) necessária para produção de proteínas que serão utilizadas durante o desenvolvimento embrionário tardio (MEIRELLES *et al.*, 2004). Após 12 a 18 horas de cultivo, em oócitos bovinos submetidos a MIV, ocorre uma mudança na posição de suas mitocôndrias de mais periférica para mais dispersa ao longo do citoplasma (HYTTEL *et al.*, 1986). Isso significa que a distribuição é mais periférica antes do pico de LH, se dispersando após a extrusão do corpúsculo polar, que ocorre aproximadamente 19 horas após o pico de LH, e

se mantendo difusa durante a fase de metáfase II (HYTTEL *et al.*, 1997; KRUIP *et al.*, 1983).

A reorganização das mitocôndrias em oócitos bovinos após a MIV está relacionada aos níveis de ATP nos embriões. Os embriões que se desenvolvem mais lentamente possuem menos ATP em seu citoplasma e, consequentemente, tem menor número de células (LIU; TRIMARCHI; KEEFE, 2000). Outro fator importante é que após 72 horas de cultivo embrionário ocorre a ativação do genoma do embrião. Até este momento as mitocôndrias apresentam um nível mediano de atividade, o que explica a maior proteção contra as espécies reativas de oxigênios (ROS) observada em embriões iniciais. A catalisação de moléculas, como glutatona e peroxidases, ocorre no período de maturação oocitária e confere proteção ao embrião durante as primeiras clivagens (KRISHER; BAVISTER, 1998).

As necessidades do oócito em cada estágio de desenvolvimento dependem da localização das organelas no citoplasma, e a ação dos microtúbulos e microfilamentos do citoesqueleto possibilitam seu reposicionamento (LANDIM-ALVARENGA; MAZIERO, 2018). A retomada da meiose é acompanhada por uma ampla reorganização dos microtúbulos citoplasmáticos no oócito. Microtúbulos parcialmente estáveis e longos são distribuídos no citoplasma durante a interfase, ao passo que, os centros organizadores dos microtúbulos (MTOCs) são fosforilados e aumentam sua atividade de organização de microtúbulos durante a metáfase (FAN; SUN, 2004). Desse modo, os grânulos corticais, o complexo de golgi, o retículo endoplasmático e as mitocôndrias se apresentam em diferentes posições das observadas no estágio de VG (FERREIRA *et al.*, 2009).

2.1.3 Maturação Molecular

A transcrição, o armazenamento e o processamento do mRNA, correspondem às diversas etapas da maturação molecular. O mRNA influencia diretamente nos eventos celulares subsequentes como a fertilização, formação do pró-núcleo e início da embriogênese, uma vez que o mesmo é utilizado na síntese ribossômica das proteínas (CROCOMO *et al.*, 2013).

Durante a foliculogênese ocorre a transcrição e o armazenamento do mRNA, enquanto o núcleo está dormente. Quando a meiose é retomada esse processo é finalizado, logo após a condensação dos cromossomos, uma vez que a cromatina se torna inativa. No entanto, a competência de síntese de proteínas e tradução do mRNA se mantém ao longo da embriogênese e desenvolvimento inicial do oócito (SIRARD, 2001).

Grande parte do mRNA do ooplasma está armazenado em uma forma inativa devido a sua cauda poli-A curta, o que mantém a molécula estável. As moléculas de mRNA que possuem caudas poli-A curtas não são traduzidas, portanto, a etapa inicial do seu processo de degradação é a exclusão desta sequência (TOMEK *et al.*, 2002).

A poliadenilação, que nada mais é, que o acréscimo de adeninas na extremidade 3' sob ação da poli-A polimerase, ocorre devido à ação de sinais gerados durante a maturação, fertilização e início do desenvolvimento embrionário. Assim, o início da tradução acontece devido à poliadenilação, que proporciona a liberação de moléculas repressoras acopladas ao segmento 5' do mRNA (GOTTARDI; MINGOTI, 2009). A ativação da tradução leva à síntese de proteínas utilizadas durante o início do desenvolvimento do embrião e a deadenilação gera degradação desses mRNA devido ao alongamento da cauda poli-A do citoplasma (FERREIRA *et al.*, 2009).

A reativação de mRNAs e a eficácia do seu armazenamento são comandadas pela poliadenilação que determina a competência do oócito, para sustentar posteriores estádios de desenvolvimento. Este processo desencadeia uma cascata complexa e específica de fosfo-desfosforilação de proteínas, devido ao aumento pronunciado da atividade de proteínas cinase (GOTTARDI; MINGOTI, 2009).

Há relação entre a redução do mecanismo de transcrição com o baixo potencial de desenvolvimento em oócitos na dependência do diâmetro folicular. Donnison e Pfeffer (2004) sugerem que os folículos antrais com diâmetro abaixo de 3 mm não possuem mRNA armazenados em quantidade suficiente para sustentar o desenvolvimento embrionário após a fertilização.

Um requisito básico para o crescimento folicular normal e aquisição da competência, é a associação íntima entre as células do *cumulus* e o ovócito, assim como a relação entre maturação nuclear e citoplasmática (CHANSON,

2001). A maturação e a competência oocitária, associadas à qualidade do oócito, podem ser elucidadas através do conhecimento das vias moleculares e expressão de genes das células do cumulus (ASSIDI; DIELEMAN; SIRARD, 2010).

2.2 Desenvolvimento Embrionário

O início do ciclo de vida dos mamíferos ocorre a partir da fertilização de dois gametas haploides que após a fusão dos pronúcleos, formam um zigoto diplóide, que possui propriedade totipotente (SCHATTEN, 2018). O desenvolvimento embrionário ocorre a partir de divisões celulares do oócito fertilizado, onde uma única célula sofre mitoses sucessivas até formar o embrião.

O zigoto sofre mitoses sucessivas para a replicação do material genético e formação de células-filha, chamadas de blastômeros. O conjunto de divisões celulares que caracteriza os estágios iniciais do desenvolvimento do embrião é chamado de clivagem, onde ocorre o aumento do número de células, sem, contudo, aumentar o volume total do embrião, que continua contido pela zona pelúcida. O processo de clivagem forma a mórula, que é caracterizada por um conjunto de blastômeros entre os quais não existem junções celulares comunicantes. Nesta fase, os blastômeros são células totipotentes pois, se promovermos a sua desagregação, cada blastômero teria, hipoteticamente, condições de formar um novo indivíduo (ROELEN, 2018).

Os blastômeros encontram-se frouxamente organizados, até o estágio de oito células, com os limites entre as células bem nítidos. Após essa fase, ocorre a compactação acompanhada de uma mudança morfológica no embrião. Na mórula compacta ocorre uma dificuldade de individualização dos blastômeros, causando uma retração do embrião em relação à zona pelúcida e aumento do espaço perivitelínico (ALVES; CRUZ, 2002). Nesta fase ocorre um aumento do contato celular entre os blastômeros periféricos através do aparecimento de junções comunicantes e oclusivas (WATSON; BARCROFT, 2001), se estabelecendo um epitélio de transporte na superfície externa da massa celular (BIGGERS; BELL; BENOS, 1988; STRINGFELLOW; SEIDEL, 1998). Ao mesmo tempo, aparece na superfície dos blastômeros votada para a zona pelúcida, bombas de Na^+ e K^+ e se estabelece um gradiente osmótico que passa a puxar

água para o interior da massa celular (FLEMING; GHASSEMIFAR; SHETH, 2000).

No movimento de solutos para dentro e para fora da blastocele, o TE atua como uma barreira seletiva, a enzima $\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{-ATPase}$, situadas como basolateral ao TE e nas membranas apicais, transportam para o interior da blastocele Na^+ , favorecendo por mecanismos osmóticos a posterior entrada de água. Para a formação do blastocisto, a $\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{-ATPase}$ tem sido considerada essencial por estabelecer e manter um gradiente iônico através do TE que promove o acúmulo osmótico de água no epitélio e para a formação do blastocisto (WATSON; BARCROFT, 2001).

O líquido que entra no embrião vai se depositando no espaço intercelular, dando origem a blastocele, que é uma cavidade no interior do embrião. Esta fase caracteriza o estágio de blastocisto inicial, e nela o embrião é formado por duas populações celulares distintas: trofoblasto e massa celular interna (GOPICHANDRAN; LEESE, 2003). O volume da blastocele vai aumentando ocupando gradativamente todo o espaço delimitado pela zona pelúcida, caracterizando a formação do blastocisto (RAMOS *et al.*, 2008).

A partir da formação do blastocisto, o embrião passa a crescer formando o blastocisto expandido. O aumento do tamanho do embrião e a progressiva redução na espessura da zona pelúcida faz com que essa camada se rompa e o embrião eclode. Assim, o blastocisto eclodido é caracterizado pelo rompimento da zona pelúcida, e com isso o embrião acaba entrando em contato direto com os tecidos maternos (GONÇALVES; FIGUEREDO; FREITAS, 2008).

Diversos fatores transcricionais estão envolvidos na formação da massa celular interna (MCI) e trofotoderma (TE) que compõe o blastocisto. Envolvidos diretamente na formação do trofotoderma destacam-se: CDX2, GATA3, Eomes e TEAD4. Já os relacionados ao desenvolvimento da MCI, são o OCT4, Nanog e o SOX2 (HOME *et al.*, 2009). Para garantir, a implantação do blastocisto com sucesso, o CDX2 exerce um papel fundamental na proliferação e função das células do trofotoderma (OESTRUP *et al.*, 2009). Influenciando o desenvolvimento de embriões do estágio de mórula para blastocisto, o fator transcricional GATA 3, sintetizado exclusivamente no trofotoderma, regula a transcrição do CDX2. No período pré e pós-implantação, o CDX2 expresso no

TE de embriões, atua como agente repressor da expressão de OCT4 e Nanog na MCI (SRITANAUDOMCHAI *et al.*, 2009).

De acordo com Solter (2016), o desenvolvimento da ICM e do TE pode ocorrer pela distribuição homogênea dos determinantes para orientação das células na formação do zigoto ou pela resposta celular a fatores externos interferindo nas interações celulares.

O período pré-implantacional em mamíferos pode ser caracterizado por diversos eventos, sendo que um dos mais importantes é a ativação do genoma embrionário. Quando os transcritos expressos a partir do genoma do zigoto/embrião passam a ser substituídos pelos transcritos maternos, o genoma embrionário é ativado (BARCROFT *et al.*, 2003). Para que isso aconteça, são necessárias modificações citoplasmáticas e nucleares coordenadas.

As mudanças na estrutura da cromatina de embriões em estádios iniciais desempenham um papel relevante na ativação do genoma embrionário, uma vez que o controle epigenético do DNA materno e paterno irá determinar o nível de transcrição. Para o sucesso na transcrição, mudanças citoplasmáticas, com aumento da atividade de fatores transcricionais, atuam em conjunto com as alterações na cromatina (LATHAM; SCHULTZ, 2001). A ativação do genoma, em ruminantes, ocorre por volta do estágio de 8-16 células, quando ocorrem as principais alterações nos padrões da síntese protéica e na ultraestrutura do nucléolo do blastômero (MEMILI; FIRST, 2000).

2.3 Espécie Reativa de Oxigênio – pontos positivos e negativos

Espécies químicas que apresentam pelo menos um elétron livre na camada de valência são denominadas como átomos ou moléculas. Quando estas espécies são reativas e formadas a partir do oxigênio, são chamadas de espécie reativa de oxigênio (ERO) (SILVA *et al.*, 2011).

As EROs incluem radicais e não radicais derivados de oxigênio, sendo capazes de reagir com qualquer molécula eletronicamente instável como nitrogênio, carbono ou enxofre (SILVA *et al.*, 2011).

As mitocôndrias são as organelas celulares com maior capacidade de produção de EROs, exercendo ação oxidante como receptores ou doadores de elétrons (AGARWAL; GUPTA; SHARMA, 2005; BARJA, 2007).

O processo da fosforilação oxidativa das células ocorre a partir de cinco complexos enzimáticos, sendo responsável pela produção de energia no organismo (BLIER; DUFRESNE; BURTON, 2001). Os complexos enzimáticos, citados por Blier, Dufresne e Burton (2001), funcionam como transportadores de elétrons por reações de redução oxidativa (REDOX), havendo uma molécula de oxigênio como destino final. O oxigênio (O_2) por sua vez, é convertido em uma molécula de água (H_2O), e a energia final é armazenada para a produção de ATP (Adenosine TriPhosphate). No entanto, outra parte do O_2 , produzido pela mitocôndria na fase inicial da fosforilação oxidativa, é convertido em EROs. Downling e Simmons (2009) relataram, ainda, a produção de EROS pelo mecanismo de defesa das células frente a infecções patogênicas.

A fosforilação oxidativa é um processo fundamental para o desenvolvimento dos *Eucarionthes*, porém, também é responsável pela produção de EROs. A fosforilação oxidativa é responsável pelo transporte de elétrons no processo de respiração celular (DOWNLING; SIMMONS, 2009). No entanto, o excesso de produção das EROs ou, em casos de redução dos agentes oxidantes, essas moléculas tornam-se prejudiciais ao organismo, devido ao estresse oxidativo (BLIER; DUFRESNE; BURTON, 2001; BARJA, 2007).

O estresse oxidativo afeta negativamente as ações fisiológicas no sistema reprodutivo de machos e fêmeas. As EROs ocorrem nos processos de maturação de oócitos, função luteal e esteoidogênese, e estão presentes nos embriões, ovários e tuba uterina. Dentre os efeitos deletérios, podemos citar as lesões no DNA em ambos os sexos, podendo ocasionar defeitos congênitos em diversos sistemas, assim como infertilidade em machos. Alguns autores ainda citam a infertilidade em fêmeas, porém essa desordem ainda não está bem esclarecida (AGARWAL; GUPTA; SHARMA, 2005).

Appasamy *et al.* (2007) acreditam que a produção de estrógeno e progesterona está relacionada à ação enzimática oxidante, e que dentro do folículo ocorra um estresse oxidativo do oócito. Os autores afirmam também que os níveis elevados de estrógeno possuem ação antioxidante, porém, o estresse oxidativo causa variações na produção hormonal pelas células da granulosa. Ou seja, o estresse oxidativo nas células desencadeia a redução da ação antioxidante. Observaram ainda que, a produção de outras glicoproteínas pelas células da granulosa, como a inibina A, a inibina B, a ativina A e o hormônio anti

Muelleriano podem estar relacionados com os fenômenos de peroxidação lipídica. Alguns autores sugerem, ainda, a participação de enzimas antioxidantes no oócito, sendo elas armazenadas na forma de RNA mensageiro, garantindo assim o desenvolvimento embrionário (LIVINGSTON *et al.*, 2009).

As EROs são as espécies de maior relevância na produção *in vitro* (PIV), pois são produzidas fisiologicamente pelo metabolismo dos embriões (GUERIN; MOUATASSIM; MENEZO, 2001; SILVA *et al.*, 2011). Quando em baixas concentrações a geração de EROs na produção *in vitro* de embriões, desempenha um papel fundamental para o desenvolvimento de embriões e na competência de oócitos (BLONDIN; COENEN; SIRARD 1997; GUERIN; MOUATASSIM; MENEZO, 2001). No entanto, a liberação excessiva de EROs durante a produção *in vitro* pode desencadear um processo de estresse oxidativo, ocasionando efeitos deletérios na função celular e a níveis intracelulares, produzindo apoptose (ANDRADE *et al.*, 2010; GUERIN; MOUATASSIM; MENEZO, 2001; YANG *et al.*, 1998). Quando submetido a estresse oxidativo, os embriões são danificados devido às alterações de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, alterando consideravelmente as mitocôndrias e bloqueando seu desenvolvimento (WANG *et al.*, 2002).

Vale salientar que, o estresse oxidativo também pode gerar consequências negativas nos processos de fecundação e maturação de oócitos em processos de PIV. Para corrigir este desequilíbrio, é necessário diminuir a produção de EROs ou aumentar os níveis de antioxidantes no meio de cultivo (ANDRADE *et al.*, 2010).

Wang *et al.* (2002) afirmam que há a produção de substâncias antioxidantes dentro dos folículos e oviduto, o que parece proteger os embriões e oócitos do estresse oxidativo. Porém, durante a PIV, esse mecanismo sofre alterações pela diferente composição do meio, sugerindo, então, a adição de antioxidantes para melhorar a eficiência na produção de embriões. Assim, o uso de antioxidantes na PIV tem a função de balancear a formação de EROs, visando manter as funções fisiológicas dos oócitos (ANDRADE *et al.*, 2010).

2.4 Anetol

Visando reduzir a produção de EROs e, conseqüentemente, o estresse oxidativo durante os procedimentos de PIV e MIV, a suplementação dos meios de maturação e de cultivo têm sido recomendados para maior eficiência (CROCOMO *et al.*, 2012). Para tanto são utilizados compostos de baixo peso molecular como ácido ascórbico, tocoferol, selênio, zinco e taurinas, bem como compostos organossulfurados como cistina, cisteína, cisteamina e beta-mercaptoetanol, vem sendo utilizados para essa finalidade (MATOS *et al.*, 2002).

Recentemente, o anetol tem sido foco de diversas pesquisas, sendo utilizado como antioxidante em processos de PIV e MIV (SÁ *et al.*, 2017). Anetol é um tipo de composto aromático amplamente encontrado na natureza em óleos essenciais. Contribui para os sabores distintos de erva-doce e erva-doce (ambos da família botânica *Apiaceae*), murta de erva-doce (*Myrtaceae*), alcaçuz (*Fabaceae*), cânfora, flores de magnólia, anis estrelado (*Illiciaceae*) e muitas outras plantas como o *Croton zehntneri Pax et Hoffm.* O anetol natural ocorre em altas concentrações no óleo de anis (80-90%), óleo de anis estrelado (mais de 90%) e óleo de erva-doce (80%) (MARINOV; VALCHEVA-KUZMANOVA, 2015).

O anetol (trans-1-metoxi-4-(1-propenil)-benzeno) é o principal componente do óleo de erva-doce, 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” (LEAL-CARDOSO; FONTELES, 1999; MARINOV; VALCHEVA-KUZMANOVA, 2015).

Sua estrutura química é composta de 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 (MARINOV; VALCHEVA-KUZMANOVA, 2015).

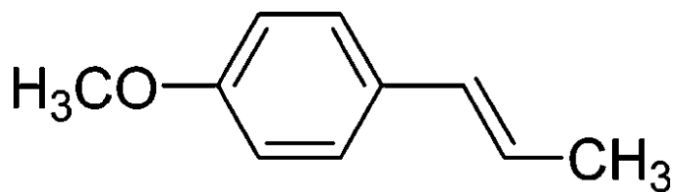


Figura 3. Estrutura química do Anetol. A figura acima descreve a estrutura química do Anetol existe como isômeros cis e trans, envolvendo a ligação dupla fora do anel. Mas o isômero abundante, e o preferido para uso, é o isômero trans ou E. O anetol (trans-1-metoxi-4-(1-propenil)-benzeno) é o principal 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” Fonte: Marinov e Valcheva-Kuzmanova (2015).

O anetol é amplamente empregado como um aditivo aromatizante e aroma em produtos da indústria alimentícia, como doces, assados, mastigáveis, goma de mascar, cigarros e outros (MARINOV; VALCHEVA-KUZMANOVA, 2015).

É um eficiente antioxidante, antienfiamatório, anticancerígeno e anti-inflamatório que age reduzindo a peroxidação lipídica pela redução de radicais hidroxilas. O anetol e seu derivado, anetol ditoletona (ADT), possui a capacidade de aumentar os níveis das enzimas antioxidantes como a Superóxido Dismutase e a catalase e Glutathione (GSH) e glutathione-S-transferase (GST) um antioxidante endógeno, desempenha um papel fundamental na proteção contra danos de ROS (CHAINY *et al.*, 2000).

Nos processos de respiração celular, o mecanismo de quebra das moléculas orgânicas pode ser dividido em aeróbica e anaeróbica, na primeira fase, a glicólise ao seu final gera moléculas de ácido pirúvico passam para o interior das mitocôndrias para continuidade do processo. A participação ativa das mitocôndrias no Ciclo de Krebs no processo de respiração celular por meio da cadeia transportadora de elétrons, é a principal fonte geradora de radicais livres, e por sua vez formadora de EROS. Naturalmente, o organismo dispõe de um sistema de defesa contra o excesso de radicais livres e, conseqüentemente EROS. Naturalmente, o organismo dispõe de um sistema de defesa contra o excesso de radicais livres, um desses sistemas de defesa é a Glutathione Peroxidase (GPx) uma enzima responsável pela detoxificação de peróxidos orgânicos e inorgânicos. A ação do anetol como antioxidante está diretamente relacionada com as mitocôndrias quando aumenta a Glutathione que cataliza a

redução do H₂O₂ a H₂O e assim diminuir o níveis de radicais livres (ANJO *et al.*, 2019; BARBOSA *et al.*, 2010; CAMPOS; LEME, 2018,).

O anetol e seus análogos estruturais também são inibidores potentes dos efeitos divergentes induzidos pelo TNF e atuam em uma etapa inicial na cascata de transdução de sinal dependente do TNF (CHAINY *et al.*, 2000). O anetol é inibidor potente da ativação de NF- κ B induzida por TNF (uma resposta precoce), a fosforilação e degradação de I κ B α e expressão do gene repórter NF- κ B. A supressão da fosforilação de I κ B α e da expressão do gene repórter NF- κ B induzida por TRAF2 e NIK, sugere que o anetol atua na quinase I κ B α (CHAINY *et al.*, 2000).

Muitos pesquisadores avaliaram a composição e utilizações dos tipos químicos presentes nesta planta, sendo citados efeitos anti-inflamatórios, sedativo, estimulador de apetite, anticarcinogênio e antioxidante (AGRA *et al.*, 2008; CHAINY *et al.*, 2000; DUVOIX *et al.*, 2004; GHELARDINI; GALEOTTI; MAZZANTI, 2001; MORAIS *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2001; SÁ *et al.*, 2017).

O estudo de Anjo *et al.*, (2019) confirmou que a suplementação do meio MIV com anetol melhorou as taxas de blastocistos, este sucesso foi associado à presença de anetol em meio IVP em vez de em meio MIV. Ao avaliar os níveis de ROS se constatou também uma diminuição em IVP quando suplementado com anetol confirmando seu potencial antioxidativo. Moraes *et al.* (2006) confirmaram a ação antioxidante do anetol a partir da observação das características químicas do composto na inibição da peroxidação lipídica. Sua capacidade de reduzir o estresse oxidativo também foi observado por Sahpaz *et al.* (2002), em experimentos *in vitro* e por Freire *et al.* (2005), *in vivo*. Sá *et al.* (2017) relatam a melhora do número de oócitos competentes durante cultivo de folículos secundários *in vitro* de caprinos com a utilização de anetol como suplementação do meio de cultivo. Porém, Magalhães-Padilha *et al.* (2013), afirmam não existir relatos dos efeitos *in vitro* do anetol em folículos pré-antrais.

Recentemente, o uso de anetol durante a MIV e CIV foi relatado em bovinos, melhorando a atividade mitocondrial dos oócitos e a produção embrionária (SÁ *et al.*, 2019). Entretanto, a forma como isso acontece ainda precisa ser melhor estudada.

2.5 Hipótese

A suplementação dos meios de MIV e CIV com o anetol aumenta a produção e qualidade de embriões de bovinos produzidos *in vitro*.

2.6 Objetivos

Objetiva-se avaliar o efeito do anetol, nas doses de 300 e 3000ug/mL, na maturação oocitária (Experimento 1) e avaliar o efeito do anetol na MIV e/ou CIV, na dose de 300µg/mL, na produção e qualidade de embriões bovinos (Experimento 2).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASSI. L.; EL-HAYEK. S.; CARVALHO, K. F.; WANG, W.; YANG. Q.; GRANADOS-APARICI, S.; MONDADORI, R.; BORDIGNON, V.; CLARKE, H. J. Epidermal growth factor receptor signaling uncouples germ cells from the somatic follicular compartment at ovulation. **Nature Communication**, v.12, n.1, p.1-13,2021.

ADHIKARI, D.; LIU, K. The regulation of maturation promoting factor during prophase I arrest and meiotic entry in mammalian oocytes. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 382, p. 480-487, 2014.

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive biology and endocrinology**, v. 3, n. 1, p. 1-21, 2005.

AGRA, M. de F. *et al.* Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 18, p. 472-508, 2008.

ALVES, M. S. D.; CRUZ, V. L. B. **Embriologia**. 7. ed. Belo Horizonte: Imprensa Universitária da UFMG; 2002.

ANCIOTO, K. L.; VANTINI, R.; GARCIA, L. M.; MINGOTI, G. Z. Influência das células do cumulus e do meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos sobre a maturação nuclear e aquisição da competência do desenvolvimento embrionário. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p.114, 2004.

ANDRADE, E. R.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução

e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, p.79-85, 2010.

ANJOS, J. C. *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**, v. 27, n. 6, p. 382-385, 2019.

APPASAMY, M.; JAUNIAUX, E.; SERHAL, P.; AL-QAHTANI, A.; GROOME, N. P.; MUTTUKRISHNA, S. Evaluation of the relationship between follicular fluid oxidative stress, ovarian hormones, and response to gonadotropin stimulation. **Fertility and Sterility**, v. 89, p. 912-921, 2007.

ASSIDI, M.; DIELEMAN, S. J.; SIRARD, M. A. Cumulus cell gene expression following the LH surge in bovine preovulatory follicles: potential early markers of oocyte competence. **Reproduction**, v. 140, n. 6, p. 835, 2010.

BARBOSA, K. B. F. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, p. 629-643, 2010.

BARCROFT, L. C.; OFFENBERG, H.; THOMSEN, P.; WATSON, A. J. Aquaporin proteins in murine trophectoderm mediate trans-epithelial water movements during cavitation. **Developmental Biology**, v. 256, p.342-354, 2003.

BARJA, G. Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated: implications for aging studies. **Rejuvenation research**, v. 10, n. 2, p. 215-224, 2007.

BÉZARD, J. Aspects of in vivo and in vitro fertilization of the equine oocyte. **Arquivos da Faculdade de Veterinária**, Porto Alegre, v. 25, n. 1, p. 36-61, 1997.

BIGGERS, J. D.; BELL, J. E.; BENOS, D. J. Mammalian blastocyst: transport functions in a developing epithelium. **American Journal of Physiology**, v. 255, p. 419-432, 1988.

BILODEAU-GOESEELS, S. Bovine oocyte meiotic inhibition before in vitro maturation and its value to in vitro embryo production: does it improve developmental competence? **Reproduction in Domestic Animal**, v. 47, p. 687-693, 2012.

BILODEAU-GOESEELS, S.; KASTELIC, J. P. Factors affecting embryo survival and strategies to reduce embryonic mortality in cattle. **Canadian journal of animal science**, v. 83, n. 4, p. 659-671, 2003.

BLIER, P. U.; DUFRESNE, F.; BURTON, R. S. Natural selection and the evolution of mtDNA-encoded peptides: evidence for intergenomic co-adaptation. **TRENDS in Genetics**, v. 17, n. 7, p. 400-406, 2001.

BLONDIN, P.; COENEN, K.; SIRARD, M. A. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. **Journal of Andrology**, v.18, p.454-460, 1997.

BORNSLAEGER, E. A.; MATTEI, P.; SCHULTZ, R. M. Involvement of cAMP-dependent protein kinase and protein phosphorylation in regulation of mouse oocyte maturation. **Developmental Biology**, v. 114, p. 453-462, 1986.

BRACKETT, B. G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M. L.; DONAWICK, W. J.; EVANS, J. F.; DRESSEL, M.A. Normal development following in vitro fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v. 27, p. 147-158, 1982.

BUCCIONE, R.; VANDERHYDEN, B. C.; CARON, P. J.; EPPIG, J. J. FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus in vitro is dependent upon a specific factor (s) secreted by the oocyte. **Developmental biology**, v.138, n.1, p.16-25, 1990.

CAMPOS, C. O.; VIREQUE, A. A.; CAMPOS, J. R.; SILVA, A. C. J. S. R. The influence of interaction between oocyte and granulosa cells on the results of procedures in assisted reproduction. **Feminina**, v. 39, n. 4, p. 207-216, 2011.

CAMPOS, M. T. G.; LEME, F. de O. P. Estresse oxidativo: fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial. **Pubvet**, v. 12, p. 139, 2018.

CARABATSOS, M. J.; SELLITTO, C.; GOODENOUGH, D. A; ALBERTINI, D. F. Oocyte-granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. **Developmental Biology**, v.226, p.167-79, 2000.

CASTRO, L. S. *et al.* Sperm oxidative stress is detrimental to embryo development: a dose-dependent study model and a new and more sensitive oxidative status evaluation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

CHAINY, G. B. N.; MANNA, S. K.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. 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**, v. 19, p. 2943–2950, 2000.

CHANSON, A. Involvement of connexin 43 in meiotic maturation of bovine oocytes. **Reproduction**, v. 122, p. 619-628, 2001.

CHOI, T.; AOKI, F.; MORI, M.; YAMASHITA, M.; NAGAHAMA, Y.; KOHMOTO, K. Activation of p34cdc2 protein kinase activity in meiotic and mitotic cell cycles in mouse oocytes and embryos. **Development**, v. 113, p. 789-795, 1991.

CONTI, M.; HSIEH, M.; ZAMAH, A. M.; OH, J. S. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 356, p. 65-73, 2012.

CRAN, D. G.; MOOR, R. M. Programming the oocyte for fertilization. *In*: BAVISTER, B. D.; CUMMINS, J.; ROLDAN, E. R. S. **Fertilization in mammals**. Norwell: Serono Symposia, 1990. p. 35-50.

CROCOMO, L. F.; LANDIM-ALVARENGA, F. da C.; BICUDO, S. D. Competência oocitária: importância e fatores determinantes in vivo e in vitro. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v. 13, n. 1, p. 117-125, 2019.

CROCOMO, L. F.; MARQUES FILHO, W. C.; ALVARENGA, F. D. C. L.; BICUDO, S. D. Produção de embriões in vitro: estresse oxidativo e antioxidantes. **Veterinária e zootecnia**, p. 470-479, 2012.

CROCOMO, L. F.; MARQUES FILHO, W. C.; SUDANO, M. J.; PASCHOAL, D. M.; ALVARENGA, F. D. C. L.; BICUDO, S. D. Effect of roscovitine and cycloheximide on ultrastructure of sheep oocytes. **Small Ruminant Research**, v. 109, n. 2-3, p. 156-162, 2013.

DEDIEU, T.; GALL, L.; CROZET, N.; SEVELLEC, C.; RUFFINI, S. Mitogen-activated protein kinase activity during goat oocyte maturation and the acquisition of meiotic competence. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, p. 351-358, 1996.

DEKEL, N. Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 234, p. 19-25, 2005.

DIELEMAN, S. J. *et al.* Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. **Theriogenology**, Gainesville, v. 57, p. 5-20, 2002.

DONNISON, M.; PFEFFER, P. L. Isolation of genes associated with developmentally competent bovine oocytes and quantitation of their levels during development. **Biology of reproduction**, v. 71, n. 6, p. 1813-1821, 2004.

DOWLING, D. K.; SIMMONS, L. W. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 276, n. 1663, p. 1737-1745, 2009.

DOWNS, S. M. Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. **Theriogenology**, v. 39, p. 65-79, 1993.

DUVOIX, A.; DELHALLE, S.; BLASIUS, R.; SCHNEKENBURGER, M.; MORCEAU, F.; FOUGÈRE, M.; DIEDERICH, M. Effect of chemopreventive agents on glutathione S-transferase P1-1 gene expression mechanisms via activating protein 1 and nuclear factor kappaB inhibition. **Biochemical pharmacology**, v. 68, n. 6, p. 1101-1111, 2004.

EYERS, P. A.; LIU, J.; HAYASHI, N. R.; LEWELLYN, A. L.; GAUTIER, J.; MALLER, J. L. Regulation of the G2/M transition in *Xenopus* oocytes by the cAMP-dependent protein kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 26, p. 24339-24346, 2005.

FAN, H. Y.; SUN, Q. Y. Involvement of mitogenactivated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 3, p. 535-547, 2004.

FERREIRA, E. M.; VIREQUE, A. A.; ADONA, P. R.; MEIRELLES, F. V.; FERRIANI, R. A.; NAVARRO, P. A. A. S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 836-848, 2009.

FLEMING, T. P.; GHASSEMIFAR, M. R.; SHETH, B. Junctional complexes in the early mammalian embryo. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 18, p. 185-193, 2000.

FONTANA, J. *et al.* Metabolic cooperation in the ovarian follicle. **Physiol. Res.**, v. 69, p. 33-48, 2020.

FRANTZ, N.; BOS-MIKICH, A.; FERREIRA, M. O.; FRANTZ, G. N.; OLIVEIRA, N. P. de. Origem, crescimento, degeneração e maturação in vitro do oócito. **Femina**, v. 34, n. 8, p. 538, 2006.

FREIRE, R. S., MORAIS, S. M., CATUNDA-JUNIOR, F. E. A., PINHEIRO, D. C. Synthesis and antioxidant, anti-inflammatory and gastroprotector activities of anethole and related compounds. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 13, n. 13, p. 4353-4358, 2005.

GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; MAZZANTI, G. Local anaesthetic activity of monoterpenes and phenylpropanes of essential oils. **Planta medica**, v. 67, n. 6, p. 564-566, 2001.

GILCHRIST, R. B. *et al.* Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides. **Reproduction**, v. 152, n. 5, p. R143-R157, 2016.

GILCHRIST, R. B.; LANE, M.; THOMPSON, J. G. Oocyte-secreted factors: regulators of 1006 cumulus cell function and oocyte quality. **Human Reproduction Update**, v.14, p.159-177, 2008.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008.

GOPICHANDRAN, N; LEESE, H. J. Metabolic characterization of the bovine blastocyst, inner cell mass, trophectoderm and blastocoel fluid. **Reproduction**, v. 126, p. 299-308, 2003.

GOTTARDI, F. P.; MINGOTI, G. Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 2, p. 82-94, 2009.

GUERIN, P. E. L.; MOUATASSIM, S.; MENEZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**, v.7, p.175-189, 2001.

HAGHIGHAT, N.; VAN WINKLE, L. J. Developmental change in follicular cell-enhanced amino acid uptake into mouse oocytes that depends on intact gap junctions and transport system Gly. **Journal of Experimental Zoology**, v. 253, n. 1, p. 71-82, 1990.

HASHIMOTO, N.; KISHIMOTO, T. Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturationpromoting factor during mouse oocyte maturation. **Developmental Biology**, v.126, p. 242-252, 1988.

HASHIMOTO, S.; MINAMI, N.; TAKAKURA, R.; IMAI, H. Bovine immature oocytes acquire developmental competence during meiotic arrest in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1696-1701, 2002.

HOLT, J. E.; LANE, S. I. R.; JONES, K. T. The control of meiotic maturation in mammalian oocyte. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 102, p. 207-226, 2013.

HOME, P.; RAY, S.; DUTTA, D.; BRONSHTEYN, I.; LARSON, M.; PAUL, S. GATA3 is selectively expressed in the trophectoderm of peri-implantation embryo and directly regulates Cdx2 gene expression. **Journal of Biological Chemistry** v. 284, p. 28729-28737, 2009.

HUANG, C. C. *et al.* Birth after the injection of sperm and the 2239 cytoplasm of tripronucleate zygotes into metaphase II oocytes in patients with repeated implantation failure after assisted fertilization procedures. **Fertility and Sterility**, v. 72, p. 702-706, 1999.

HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 23-32, 1997.

HYTTEL, P.; XU, K. P.; SMITH, S.; GREVE, T. Ultrastructure of in vitro oocyte maturation in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 78, p. 615-625, 1986.

JELINKOVA, L.; KUBELKA, M.; MOTLIK, J.; GUERRIER, P. Chromatin condensation and histone H1 kinase activity during growth and maturation of rabbit oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 37, p. 210-215, 1994.

JONES, K. T. Anaphase-promoting complex control in female mouse meiosis. **Results and Problems in Cell Differentiation**, v. 53, p. 343-363, 2011.

JUENGEL, J. L.; MCNATTY, K. P. The role of proteins of the transforming growth factor- β superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. **Human Reproduction Update**, v. 11, n. 2, p. 144-161, 2005.

KRISHER, R. L.; BAVISTER, B. D. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. **Theriogenology**, v. 59, p.103-114, 1998.

KRUIP, T. A. M.; CRAN, D. G.; VAN BENEDEN, T. H.; DIELEMAN, S. J. Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vivo. **Gamete Research**, v. 8, p. 29-47, 1983.

KUBELKA, M.; MOTLÍK, J.; SCHULTZ, R. M.; PAVLOK, A. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. **Biology of reproduction**, v. 62, n. 2, p. 292-302, 2000.

LANDIM-ALVARENGA F. C.; MAZIERO R. R. D. Control of oocyte maturation. **Animal Reproduction**, v. 11, n. 3, p.150-158, 2014.

LANDIM-ALVARENGA, F. C. Produção in vitro de embriões equinos: avanços e limitações. **Arq Fac Vet UFRGS**, v. 27, p. 54-89, 1999.

LANDIM-ALVARENGA, F. C.; MAZIERO, R. R. D. Control of oocyte maturation. **Animal Reproduction**. v. 11, n. 3, p. 150-158, 2018.

LATHAM, K. E.; SCHULTZ, R. M. Embryonic genomic activation. **Frontier in Bioscience**, v.6, p.748-759, 2001.

LEAL-CARDOSO, J. H.; FONTELES, M. C. Pharmacological effects of essential oils of plants of the northeast of Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 71, n. 2, p. 207-213, 1999.

LEW, D. J.; KORNBLUTH, S. Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 8, p. 795-804, 1996.

LIU, L.; TRIMARCHI, J. R.; KEEFE, D. L. Involvement of mitochondria in oxidative stress-induced cell death in mouse zygotes. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 1745-1753, 2000.

LIVINGSTON, T.; RICH, K.; MACKENZIE, S.; GODKIN, J. D. Glutathione content and antioxidant enzyme expression of in vivo matured sheep oocytes. **Animal Reproduction Science**, 116, p. 265-273, 2009.

MACAULAY, A. D.; GILBERT, I.; CABALLERO, J; BARRETO, R; FOURNIER, E; TOSSOU, P; SIRARD M.A; CLARKE KHAND, H.J; KHANDJIAN, E. W.; RICHARD, F. J. The gametic synapse: RNA transfer to the bovine oocyte. **Biology of reproduction**, v. 91, n. 4, p. 90, 1-12, 2014.

MAGALHÃES-PADILHA, D. M.; GEISLER-LEE, J.; WISCHRAL, A.; GASTAL, M. O.; FONSECA, G. R.; ELOY, Y. R., GASTAL, E. L. Gene expression during early folliculogenesis in goats using microarray analysis. **Biology of reproduction**, v. 89, n. 1, p. 19, 1-12, 2013.

MALLER, J. L.; KREBS, E. G. Regulation of oocyte maturation. **Current topics in cellular regulation**, v. 16, p. 271-311, 1980.

MARINOV, V.; VALCHEVA-KUZMANOVA, S. Review on the pharmacological activities of anethole. **Scripta scientifica pharmaceutica**, v. 2, n. 2, p. 14-19, 2015.

MATOS, D. G. de; HERRERA, C.; CORTVRINDT, R.; SMITZ, J.; VAN SOOM, A.; NOGUEIRA, D.; PASQUALINI, R. S. 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**, v. 62, p. 203-209, 2002.

MEIRELLES, F. V.; CAETANO, A. R.; WATANABE, Y. F.; RIPAMONTE, P.; CARAMBULA, S. F.; MERIGHE, G. K. Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 82/83, p. 3-20, 2004.

MELLO, R. R.C. *et al.* Produção in vitro (PIV) de embriões em bovinos. **Revista brasileira de Reprodução Animal**, v. 40, n. 2, p. 58-64, 2016.

MEMILI, E.; FIRST, N. L. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. **Zygote**, v. 8, n. 1, p. 87-96, 2000.

MERAN, S.; LUO, D. D.; SIMPSON, R.; MARTIN, J.; WELLS, A.; STEADMAN, R.; PHILLIPS, A. O. Hyaluronan facilitates transforming growth factor- β 1-dependent proliferation via CD44 and epidermal growth factor receptor interaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 20, p.17618-17630, 2011.

MORAIS, S. M. D.; CATUNDA JÚNIOR, F. E. A.; SILVA, A. R. A. D.; MARTINS NETO, J. S.; RONDINA, D.; CARDOSO, J. H. L. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de Croton do nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.

NAITO, K.; TOYODA, Y. Fluctuation of histone H1 kinase activity during meiotic maturation in porcine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 93, p. 467-473, 1991.

NORRIS, R. P.; RATZAN, W. J.; FREUDZON, M.; MEHLMANN, L. M.; KRALL, J.; MOVSESIAN, A.; WANG, H.; KE, H.; NIKOLAEV, V. O.; JAFFE, L. A. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. **Development**, v. 136, p. 1869-1878, 2009.

OESTRUP, O.; HALL, V.; PETKOV, S. G.; WOLF, X. A.; HYLDIG, S.; HYTTEL, P. From Zygote to Implantation: Morphological and Molecular Dynamics during Embryo Development in the Pig. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 44, p. 39-49, 2009.

OH, B.; HAMPL, A.; EPPIG, J. J.; SOLTER, D.; KNOWLES, B. B. Spin, a substrate in the MAP kinase pathway in mouse oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 50, p. 240-249, 1998.

OH, J. S.; HAN, S. J.; CONTI, M. Wee1B, Myt1, and Cdc25 function in distinct Compartments of the mouse oocyte to control meiotic resumption. **Journal of Cell Biology**, v. 188, p. 199-207, 2010.

OLIVEIRA, A. C.; LEAL-CARDOSO, J. H.; SANTOS, C. F.; MORAIS, S. M.; COELHO-DE-SOUZA, A. N. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton zehntneri* in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 1471-1474, 2001.

PIRINO, G.; WESCOTT, M. P.; DONOVAN, P. J. Protein kinase A regulates resumption of meiosis by phosphorylation of Cdc25B in mammalian oocytes. **Cell Cycle**, v. 8, p. 665-670, 2009.

QUETGLAS, M. D.; ADONA, P. R.; BEM, T. H. C. de; PIRES, P. R. L.; LEAL, C. L. V. Effect of cyclin-dependent Kinase (CDK) inhibition on expression, localization and activity of maturation promoting factor (MPF) and mitogen activated protein kinase (MAPK) in bovine oocytes. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 45, p.1074-1081, 2010.

RAMOS, E. M.; CAVALCANTE, T. V.; NUNES, R. R. M.; OLIVEIRA, C. M.; SILVA, S. M. M. de S.; DIAS, F. E. F.; ARRIVABENE, M. Morfometria ovariana de vacas zebuínas criadas na Amazônia Oriental. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 4, 2008.

RICHANI, D. *et al.* Metabolic co-dependence of the oocyte and cumulus cells: essential role in determining oocyte developmental competence. **Human Reproduction Update**, v. 27, n. 1, p. 27-47, 2021.

RICHANI, D.; DUNNING, K. R.; THOMPSON, J. G.; GILCHRIST, R. B. Metabolic co-dependence of the oocyte and cumulus cells: essential role in determining oocyte developmental competence. **Human Reproduction Update**, v. 27, n.1, p. 27-47, 2021.

ROBINSON, J. W.; ZHANG, M.; SHUHAIBAR, L. C.; NORRIS, R. P.; GEERTS, A.; WUNDER, F.; EPPIG, J. J.; POTTER, L. R.; JAFFE, L. A. Luteinizing hormone reduces the activity of the NPR2 guanylyl cyclase in mouse ovarian follicles, contributing to the cyclic GMP decrease that promotes resumption of meiosis in oocytes. **Developmental Biology**, v. 366, p. 308-316, 2012.

ROELEN, B. A. J. Desenvolvimento de epiblasto. **Encyclopedia of Reproduction**. Utrecht: elsevier, 2018. p. 341-346.

RYBSKA, M. *et al.* Cytoplasmic and nuclear maturation of oocytes in mammals—living in the shadow of cells developmental capability. **Medical Journal Cell Biology**, v. 6, p. 13-17, 2018.

SÁ, N. A. R.; ARAÚJO, V. R.; CORREIA, H. H. V.; FERREIRA, A. C. A.; GUERREIRO, D. D.; SAMPAIO, A. M. et al. Anethole improves the in vitro development of isolated caprine secondary follicles. **Theriogenology**, v. 89, 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.; CARDENAS, 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, 20219.

SAHPAZ, S.; GARBACKI, N.; TITS, M.; BAILLEUL, F. Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoid esters from *Marrubium vulgare*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 79, n. 3, p. 389-392, 2002.

SCHATTEN, H. Cleavage and Cleavage Patterns in Embryogenesis. **Encyclopedia of Reproduction**. Columbia: elsevier, 2018. p. 314-319.

SELA-ABRAMOVICH, S.; EDRY, I.; GALIANI, D.; NEVO, N.; DEKEL, N. Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation. **Endocrinology**, v. 147, p. 2280-2286, 2006.

SILVA, G. M.; ARAÚJO, V. R.; DUARTE, A. B. G.; LOPES, C. A. P.; FIGUEIREDO, J. R. Papel dos antioxidantes no cultivo in vitro de células ovarianas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, p. 315-326, 2011.

SIMPSON, R. M. L; WELLS, A.; THOMAS, D.; STEPHENS, P.; STEADMAN, R.; PHILIPIS, A. Aging fibroblasts resist phenotypic maturation because of impaired hyaluronan-dependent CD44/epidermal growth factor receptor signaling. **The American Journal Pathology**, v. 176, n. 3, p. 1215-28, 2010.

SIRARD, M. A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1241-1254, 2001.

SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**, v. 49, p. 483-497, 1998.

SMITZ, J. E. J.; NOGUEIRA, D.; MATOS D. G. V.; CORTVRINDT, R. N. Oocyte: in vitro maturation. In: Suh CS, Sonntag B, Erickson GF. The ovarian life cycle: a contemporary view. **Reviews in Endocrine Metabolic Disorders**, v. 3, p. 5-12, 2004.

SOLTER, D. Preformation versus epigenesis in early mammalian development. **Current Topics in Developmental Biology**, v.117, p.377-391, 2016.

SRITANAUDOMCHAI, H.; SPARMAN, M.; TACHIBANA, M.; CLEPPER, L.; WOODWARD, J.; GOKHALE, S.; WOLF, D.; HENNEBOLD, J.; HURLBUT, W.; GROMPE, M.; MITALPOV, S. CDX2 in the formation of the trophectoderm lineage in primate embryos. **Developmental Biology**, v. 335, p.179-187, 2009.

STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. Illinois: Savoy, IETS, 1998. p.112-113.

SULLIVAN, M.; MORGAN, D. O. Finishing mitosis, one step at a time. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, p. 894-903, 2007.

TAIEB, F.; THIBIER, C.; JESSUS, C. On cyclins oocytes and eggs. **Molecular Reproduction and Development**, v.48, p.396-411, 1997.

TOMEK, W., STERZA, F. M.; KUBELKA, M.; WOLLENHAUPT, K.; TORNER, H.; ANGER, M.; KANITZ, W. Regulation of translation during in vitro maturation of bovine oocytes: the role of MAP kinase, eIF4E (cap binding protein) phosphorylation, and eIF4E-BP1. **Biology of reproduction**, v. 66, n. 5, p. 1274-1282, 2002.

TORRES-OSORIO, V. *et al.* Oxidative stress and antioxidant use during in vitro mammal embryo production. Review. **Rev. mex. de cienc. pecuarias**, Mérida, v. 10, n. 2, p. 433-459, jun. 2019.

TROUNSON, A.; ANDERIESZ, C.; JONES, G. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. **Reproduction**, v. 121, p. 51-75, 2001.

VACCARI, S.; WEEKS, 2ND J. L.; HSIEH, M.; MENNITI, F. S.; CONTI, M. Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 81, p. 595-604, 2009.

VAN BLERKOM J. Microtubule mediation of cytoplasmic and nuclear maturation during the early stages of resumed meiosis in cultured mouse oocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 88, p. 5031-5035, 1991.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1717-1751, 2005.

WANG, X.; FALCONE, T.; ATTARAN, M.; GOLDBERG, J. M.; AGARWAL, A.; SHARMA, R. K. Vitamin C and Vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. **Fertility and Sterility**, v. 78, p.1272-1277, 2002.

WATSON, A. J.; BARCROFT, L. C. Regulation of blastocyst formation. **Frontier in Bioscience**, v. 6, p. 708-730, 2001.

WU, B.; IGNOTZ, G.; CURRIE, W. B.; YANG, X. Dynamics of maturation-promoting factor and its constituent proteins during in vitro maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 253-259, 1997.

YANG, H. W.; HWANG, K. J.; KWON, H. C.; KIM, K. W.; OH K. S. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. **Human Reproduction**, v. 13, p. 998-1002, 1998.

ZHANG, M.; SU, Y. Q.; SUGIURA, K.; XIA, G.; EPPIG, J. J. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. **Science**, v. 330, p. 366-369, 2010.

ZHANG, Y.; ZHANG, Z.; XU, X-Y.; LI, X-S.; YU, M.; YU, A-M.; ZONG, Z-H.; YU, B-Z. Protein kinase a modulates Cdc25B activity during meiotic resumption of mouse oocytes. **Developmental Dynamics**, v. 237, p. 3777-3786, 2008.

CAPÍTULO II

ARTIGO

Ludimila Cardoso Zoccal Janini^a, Thaisy Tino Dellaqua, Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga^a

^a Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.

^b Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.

*Corresponding author.

Nome: Ludimila Cardoso Zoccal Janini

Tel.: (+55) 17 99757-3014

E-mail address: ludimila.cz.janini@unesp.br

Artigo redigido segundo as normas da THERIOGENOLOGY (ISSN 0093-691X),
ranqueada como A1 pelo QUALIS – CAPES de 2016

<https://www.elsevier.com/journals/theriogenology/0093-691X/guide-for-authors>

1. Introdução

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma biotecnologia que vem se difundindo exponencialmente há várias décadas [1]. Na produção *in vivo* de embriões bovinos, aproximadamente 80% dos oócitos ovulados desenvolvem-se até blastocistos após a fertilização, enquanto que na PIV, apenas 40% atingem este estágio [2]. Esta baixa eficiência é consequência da maturação oocitária ineficiente, pois oócitos maturados *in vitro* apresentam menor competência de desenvolvimento do que aqueles maturados *in vivo*, além de serem menos resistentes à criopreservação [3-5]. Dessa forma, a maturação *in vitro* (MIV) é uma etapa fundamental para a PIV, atuando diretamente na preparação do oócito para seu desenvolvimento após a fertilização.

Para o sucesso na PIV, a obtenção de oócitos de boa qualidade, com boas características morfológicas e de desenvolvimento, torna-se imprescindível. Essas características dependem do tamanho do folículo de origem e da extensão e integridade das células do *cumulus*, que influenciam diretamente na competência oocitária [6]. Nesse sentido, a retirada do complexo *cumulus-oócito* (CCO) do ambiente folicular promove a retomada espontânea da meiose, pois interrompe a ação de inibidores meióticos das células foliculares e do fluido folicular sobre o CCO, o que compromete o processo adequado de maturação oocitária [7].

Desequilíbrios nutricionais, distúrbios hormonais e estresse oxidativo podem impactar no desenvolvimento de oócitos e embriões [8,9]. A cultura *in vitro* pode estimular maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e, em altos níveis, as EROS provocam estresse oxidativo celular e interferem nas estruturas moleculares e celulares do oócito alterando a competência oocitária [10, 11]. Sob estresse oxidativo, os oócitos e embriões são danificados devido às alterações de lipídios, proteínas, DNA e RNA, o que modifica consideravelmente a atividade das mitocôndrias, interferindo na fertilização e posterior desenvolvimento embrionário [12,13]. Estudos anteriores mostraram que a participação de enzimas endógenas antioxidantes no metabolismo do oócito, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), peroxirredoxinas (Prx), glutathione (GSH), glutathione redutase (GR), auxiliam a neutralizar as quantidades excessivas de EROS, além de prevenir danos celulares, assegurando melhor desenvolvimento oocitário e embrionário [14-17].

Visando reduzir a produção de EROs e consequentemente o estresse oxidativo durante os procedimentos de MIV e cultivo *in vitro* (CIV), a suplementação dos meios de

maturação e cultivo tem sido recomendada para melhorar a eficiência da produção embrionária [18]. Compostos de baixo peso molecular como ácido ascórbico, tocoferol, selênio, zinco e taurinas, bem como compostos organossulfurados como cistina, cisteína, cisteamina e beta-mercaptoetanol, vêm sendo utilizados para essa finalidade [19]. Além disso, uma gama de antioxidantes é utilizada na tentativa de minimizar tais danos, como a adição de anetol em meios de maturação e CIV, a fim de melhorar a competência do oócito e posterior desenvolvimento embrionário. 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 nas células, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, além de apresentar outros benefícios como ação antiinflamatória, anestésica e até anticarcinogênica [10,11].

Sá e colaboradores [11] demonstraram que a adição de anetol durante a cultura *in vitro* de folículos secundários de caprinos melhorou o número de oócitos meioticamente competentes para a fertilização e reduziu os níveis de EROS destes folículos. Além disso, em bovinos, o uso de anetol durante a MIV e CIV melhorou a atividade mitocondrial dos oócitos e a produção embrionária [16]. Uma vez que o uso conjunto do anetol na MIV e CIV ainda não foi testado, hipotetizamos que a suplementação dos meios de MIV e CIV com o antioxidante natural anetol promoveria melhorias na qualidade e produção *in vitro* de embriões bovinos. Com base no exposto, objetivou-se avaliar o efeito do anetol, na dose de 300 e 3000 µg/mL durante a MIV sobre a maturação oocitária (Experimento 1) e avaliar o efeito de 300 µg/mL de anetol durante a MIV e/ou CIV sobre a produção e qualidade de embriões bovinos (Experimento 2).

2. Material de métodos

Todos os reagentes utilizados neste estudo foram de alta pureza e obtidos da Botupharma® (Botucatu, São Paulo, Brasil), a menos que esteja especificado.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil; sob protocolo CEUA 0022/2020. O experimento foi conduzido no Laboratório de Fisiologia Molecular Ovariana, Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biociências (IB), UNESP – Botucatu, São Paulo, Brasil.

Foram realizadas cinco réplicas do experimento I e seis do II, em replicatas independentes. Para as análises em porcentagens (taxa de MII, clivagem, produção de

blastocistos, expressão gênica de células do cúmulus e blastocistos, quantificação do estresse oxidativo através da quantificação do TBARS), o oócito/embrião foi a unidade experimental para cada replicata. Para a análise do TBARS quantificação do estresse oxidativo através da quantificação do TBARS (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico) de cada grupo experimental a unidade experimental foi o meio de cultivo. Para avaliar os efeitos da adição do anetol sobre a maturação oocitária, durante a MIV e a CIV foram realizados dois experimentos.

2.2 Obtenção dos complexos *cumulus* -oócitos (CCOs) *post mortem* e maturação *in vitro* (MIV)

Os CCOs imaturos foram coletados de ovários bovinos obtidos de frigoríficos próximos ao laboratório. Os ovários foram conduzidos ao laboratório imersos em solução salina (0,9% NaCl) à 37,5 °C e utilizados imediatamente. Após higienização dos mesmos, os folículos com diâmetro de 2 a 8 mm foram aspirados com o uso de seringa de 10 mL e agulha 19G. O fluido folicular obtido foi depositado em tubos cônicos estéreis de 15 mL aquecidos à 37,5 °C até a formação de um pellet.

Após sedimentação dos oócitos no líquido folicular, os CCOs foram recuperados e classificados como: grau I, II ou III, de acordo com suas características celulares [20], em placa de Petri com o auxílio de estereomicroscópio. Somente CCOs com citoplasma homogêneo e múltiplas camadas de células do *cumulus* compactas foram utilizados (grau I e II). Os CCOs selecionados (20-25 CCOs/grupo) foram maturados em 500 µL de meio comercial MIV® em placas de quatro poços (NUNC®) e incubados a 38,5°C com umidade saturada do ar e 5% de CO₂ durante 24 horas. Em seguida, os CCOs foram transferidos para o meio FIV ou submetidos à análise da maturação nuclear do oócito e expressão gênica das células do *cumulus*.

2.3.1 Delineamento Experimento 1: Efeito da suplementação com anetol durante a maturação oocitária *in vitro* (MIV)

Para avaliar o efeito do anetol no meio MIV sobre a maturação nuclear oocitária, três concentrações foram adicionadas ao meio base MIV®: 0, 300 e 3000 µg/ml de anetol (Trans-Anethole, Sigma-Aldrich - St. Louis, MO, EUA), caracterizando os grupos MC, M300 e M3000, respectivamente. O meio base MIV® foi composto por TCM199

tamponado com bicarbonato, FSH recombinante, EGF, 17β estradiol, amicacina e piruvato (conforme informado pelo fabricante) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB). Cinco réplicas biológicas foram realizadas. Após 24 horas de maturação, os oócitos foram desnudos e o material genético foi avaliado em microscópio de epifluorescência após coloração com Hoechst 33342 (Invitrogen, Waltham, MA, EUA). As células do *cumulus* foram armazenadas para análise de expressão gênica (Figura 1).

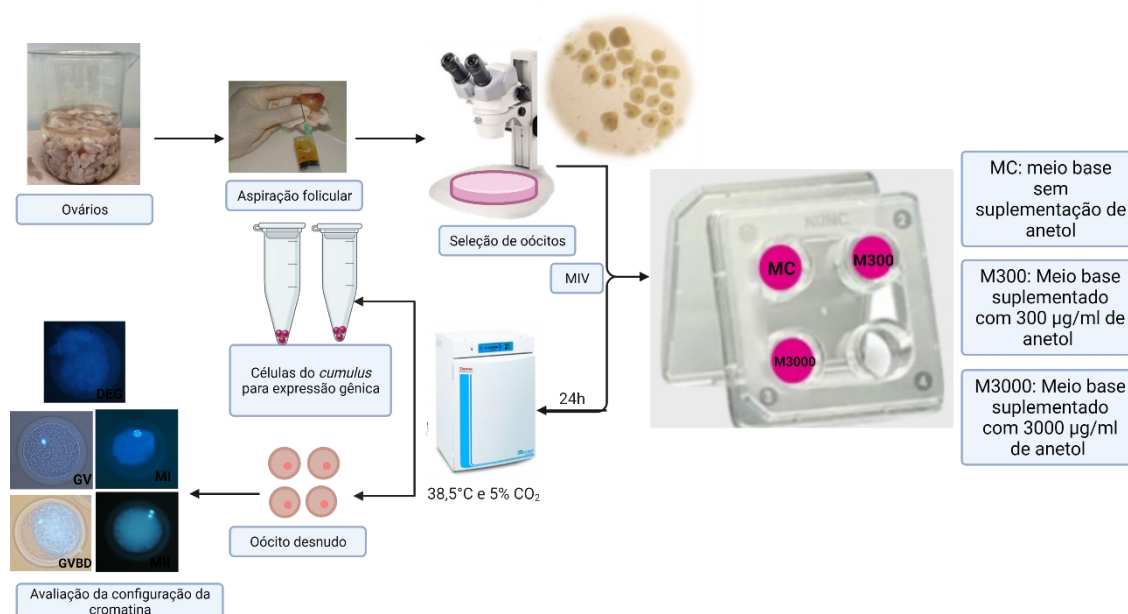


Figura. 1. Delineamento experimental para investigar os efeitos da adição do anetol no meio MIV. Os folículos de ovários provenientes de frigorífico foram aspirados e os CCOs foram selecionados e maturados durante 24 horas em meio suplementado com 0 (MC), 300 (M300) ou 3000 (M3000) $\mu\text{g/ml}$ de 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.

2.3.2 Experimento 2: Efeito da suplementação com anetol durante a maturação *in vitro* (MIV) e Cultivo *in vitro* (CIV) sobre a produção embrionária

O experimento 2 determinou os efeitos do anetol sobre o desenvolvimento embrionário. Para isto, CCOs foram maturados durante 24 horas em meio base MIV[®] (Grupo MC) ou em meio suplementado com 300 $\mu\text{g/ml}$ de anetol (grupo M300 - melhor concentração encontrada no experimento 1). Posteriormente, os oócitos foram submetidos à fecundação *in vitro* (FIV) durante 18 horas. Para a CIV, os CCOs foram divididos em 04 grupos: MC-CC (meios MIV e CIV sem adição de anetol); MC-C300 (meio MIV sem anetol e meio CIV com 300 $\mu\text{g/ml}$ de anetol); M300-CC (meio MIV com 300 $\mu\text{g/ml}$ de anetol e meio CIV sem anetol); M300-C300 (meios MIV e CIV com 300

$\mu\text{g/ml}$ de anetol). Seis réplicas biológicas foram realizadas com 25-30 estruturas por grupo em cada réplica. A taxa de clivagem (número de prováveis zigotos clivados / número de oócitos cultivados x 100) foi avaliada no segundo dia de cultivo (D3) e a taxa de blastocistos (número de blastocisto / número de oócitos cultivados x 100) após sete dias de cultivo (D8). Em seguida, os embriões foram destinados à contagem do número total de células embrionárias e análise de expressão gênica. O meio de cultivo embrionário foi destinado à quantificação dos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

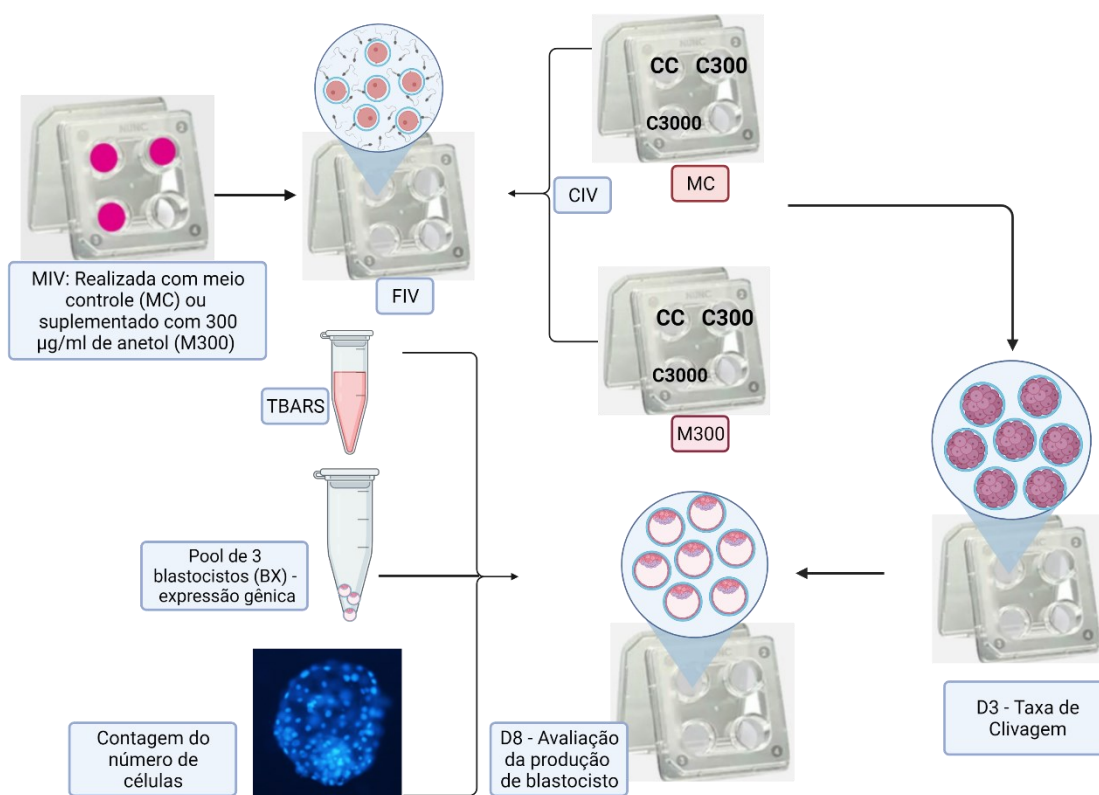


Figura.2. Delineamento experimental para investigar os efeitos da adição do anetol durante a MIV e CIV. CCOs foram maturados em meio suplementado de 0 (MC) ou 300 $\mu\text{g/ml}$ de anetol (M300). Após 24 horas de maturação, os CCOs foram fertilizados e cultivados em 4 grupos distintos, sendo: MC-CC (meios MIV e CIV sem adição de anetol); MC-C300 (meio MIV sem anetol e meio CIV com 300 $\mu\text{g/ml}$ de anetol); M300-CC (meio MIV com 300 $\mu\text{g/ml}$ de anetol e meio CIV sem anetol); M300-C300 (meios MIV e CIV com 300 $\mu\text{g/ml}$ 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).

2.4 Avaliação da Viabilidade do oócito e configuração da cromatina

Após a MIV, os CCOs foram desnudos rapidamente por vórtex e, em seguida, mecanicamente por repetidas pipetagens. Os oócitos foram incubados por um período mínimo de 30 minutos em metanol 60%, lavados em PBS e transferidos para lâminas com 10 µg/mL de Hoechst 33342 em glicerol. A configuração da cromatina foi avaliada por microscopia de epifluorescência (Nikon eclipse 80i). Os oócitos foram classificados de acordo com Cadenas e colaboradores [21] como: vesícula germinativa (GV), ruptura da vesícula germinativa (GVBD), metáfase I (MI), metáfase II (MII) ou degenerado (DEG).

2.5 Fecundação *in vitro* (FIV) e Cultivo *in vitro* (CIV)

Para este experimento foram utilizados espermatozoides criopreservados de um único touro (Bion Santa Nilsa, *bos indicus*, com partida única nº1687, fazenda Santa Nilsa). O conteúdo da palheta do sêmen criopreservado foi descongelado a 37°C por 30 segundos e os espermatozoides foram separados em gradiente descontínuo de Select Sperm®. Após contagem, os espermatozoides foram adicionados em cada poço com a concentração final de 2×10^6 espermatozoides/ml. CCOs foram lavados em meio FIV® e cultivados juntamente com os espermatozoides em 400 µL de meio FIV em placas de quatro poços (NUNC®) durante 18 horas à 38.5°C em umidade saturada do ar com 5% de CO₂. Após a FIV, os prováveis zigotos foram lavados e as células do *cumulus* removidas por agitação em vórtex. Em seguida, os prováveis zigotos foram incubados em 500 µL de meio CIV (BotuFIV® BotuPharma, Botucatu, SP, Brazil) acrescido de 2,5% de SFB com os respectivos tratamentos sob mistura gasosa de 5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂ a 38.5°C em ar umidificado (Eve®, WTA, Cravinhos, Brazil), durante 7 dias completos. No segundo dia de cultivo (D3), a taxa de clivagem (número de prováveis zigotos clivados / número de oócitos cultivados x 100) foi avaliada e no final do período de cultivo (D8) foi avaliada a produção embrionária (número de blastocisto / número de oócitos cultivados x 100). Estas taxas foram calculadas a partir do número total de oócitos. Os blastocistos foram morfológicamente classificados em blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido [22]. *Pools* de três blastocistos expandidos de cada grupo foram armazenados em Freezer -80° C (Thermo Scientific®) para posterior análise da abundância relativa dos genes e os demais foram utilizados para a contagem total dos

núcleos celulares embrionários [23]. O meio de cultivo embrionário foi destinado à quantificação dos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

2.6. Contagem do número de células dos blastocistos

Para a contagem total do número de células embrionárias, os blastocistos foram fixados em metanol 60% por 30 minutos, lavados em PBS, corados com 10 µg/mL de Hoechst 33342 (Invitrogen, Waltham, MA, EUA) em glicerol e montados entre lâmina e lamínula para a avaliação sob microscópio de fluorescência (Nikon eclipse 80i, Tokyo, Japão). A emissão de fluorescência foi captada a 352nm.

2.7 Expressão Gênica

A investigação dos padrões globais de expressão de mRNA dos embriões e das células do *cumulus* foi realizada por RT-qPCR, utilizando o sistema Sybr Green™ PCR Master Mix (Applied Biosystems™, Waltham, MA, EUA) no equipamento StepOnePlus™ System (Applied Biosystems™, Waltham, MA, EUA). Resumidamente, *pools* de 3 blastocistos expandidos e células do *cumulus* de 20 CCOs foram submetidos à extração do RNA total com o Arcturus PicoPure® RNA Isolation Kit (Applied Biosystems™, Waltham, MA, EUA) conforme instruções do fabricante. As concentrações de RNA total foram mensuradas por NanoDrop™ 2000 Spectrophotometers (Thermo Scientific™, Waltham, MA, EUA). Em seguida, o extraído foi tratado com DNase I (Qiagen®, XXXXXX) conforme protocolo do fabricante para eliminação de possível contaminação com DNA genômico e posteriormente foi realizada a transcrição reversa utilizando High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™, Waltham, MA, EUA), conforme instruções do fabricante.

O volume final do mix para PCR foi de 20 µL, em duplicada, e as condições para os ciclos da PCR foram 95°C por 10 min (1 ciclo), desnaturação a 95°C por 15 s seguida de anelamento a 60°C por 1 min (40 ciclos). Os dados brutos dos níveis de fluorescências (dados sem correção da linha de base), obtidos ao final da PCR, foram submetidos ao programa LinRegPCR [24] para correção da linha de base e obtenção dos valores do ciclo de *threshold* (Ct). A abundância relativa dos genes alvos foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. e a média geométrica da expressão dos genes *CYCA* e *GAPDH* foi utilizada como referência para a normalização dos dados, como descrito por PFAFFL [25].

As tabelas a seguir descrevem o painel de genes utilizados para esta análise nas células do *cumulus* e embriões (Tabelas 1 e 2).

Table 1. Genes analyzed in CCOs (2 reference and 7 target genes).

Gene	Sequência do primer (5'-3')	Temperatura de anelamento (°C)	Concentração final (µM)	Tamanho (bp)
GAPDH	F:GGGTCATCATCTCTGCACCT R:GGTCATAAGTCCCTCCACGA	60	300	176
CYCA	F:GCCATGGAGCGCTTTGG R: CCACAGTCAGCAATGGTGATCT	60	300	65
CASP3	F: AAGCCATGGTGAAGAAGGAA R: GGCAGGCCTGAATAATGAAA	60	300	134
GREM1	F:TGGTGCAAGGGCAAGAAGGATAGA R:CACTGTGTTTGGAGGTTGGCCTTT	60	300	125
CAT	F:CTGGGACCCAACCTATCTCCA R:GATGCTCGGGAGCACTAAAG	60	300	148
HAS2	F:GGATCTCCTTCCTCAGCAGTGT R:ATTCCCAGAGGTCCGCTAATG	60	300	106
SOD1	F:AAGGCCGTCTGCGTGCTGAA R:CAGGTCTCCAACATGCCTCT	60	300	240
COX2	F: AGCCTAGCACTTTGGGTGGAGAA R:TCCAGAGTGGGAAGAGCTTGCATT	60	300	168
βGSTA1	F: GACCAGAGCCATTCTCAACTAC R: CTTTCTCGGATTAGGGTCAG	60	300	x

Table 2. Genes analyzed in Embryos (2 reference and 7 target genes).

Gene	Sequência do primer (5'-3')	Temperatura de anelamento (°C)	Concentração final (µM)	Tamanho (bp)	Genbank id nº
GAPDH	F:GGGTCATCATCTCTGCACCT R:GGTCATAAGTCCCTCCACGA	60	300	176	NM_001034034
CYCA	F:GCCATGGAGCGCTTTGG R: CCACAGTCAGCAATGGTGATCT	60	300	65	NM_178320
CASP3	F: AAGCCATGGTGAAGAAGGAA R: GGCAGGCCTGAATAATGAAA	60	300	134	BC123503
EGFR	F: AAAGTTTGCCAAGGGACAAG R: AAAGCACATTTCTCGGATG	60	500	253	XM_002696890.3
HSPA1A	F: GGGGAGGACTTCGACAACAGG R:CGGAACAGGTCTGGAGCACAGC	60	200	245	NM_174550.1

ELOVL6	F:GGAAGCCTTTAGTGCTCTGGTC R:ATTGTATCTCCTAGTTCGGGTGC	60	300	205	NM_001102155.1
GPX1	F:GGGACTACACCCAGATGAATGA R:GCATAAAGTTGGGCTCGAA	60	300	172	NM_174076.3
IFNT2A	F:GATCCTTCTGGAGCTGGYTG R:GCCCCGAATGAACAGACTCYC	60	300	182	NM_001015511

2.8. Quantificação dos níveis de estresse oxidativo

Após o procedimento de cultivo embrionário, os meios contidos nas placas foram armazenados em tubos de 1,5 mL e congelados para posterior análise de estresse oxidativo através da quantificação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) de cada grupo experimental. Este método se baseia na reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico com uma de malondialdeído (MDA), produzindo um complexo de coloração rósea que pode ser quantificado pela leitura em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 532nm. O MDA é uma das principais substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico. Esta reação ocorre em pH ácido e em temperaturas entre 90 e 100°C [26].

Para isto, alíquotas de 200 µL do meio de cultivo embrionário e 400 µL de solução de ácido tricloroacético (TCA) a 10% foram centrifugadas por 15 min à 15 °C e 18.000 g, para provocar a precipitação de proteínas. Em seguida, alíquotas de 250 µL do sobrenadante foram colocadas em criotubos juntamente com 250 µL de TCA a 1% dissolvido em ácido sulfúrico 0.05N (H₂SO₄), preparado instantes antes de ser utilizado. Os criotubos contendo esta mistura foram incubados em banho fervente (95 °C) por 15 min e resfriados em gelo (0 °C). Após o resfriamento, o MDA presente em cada amostra foi quantificado em espectrofotômetro Ultrospec 3300pro Amersham Pharmacia® em um comprimento de onda de 532 nm. Os resultados foram comparados com uma curva padrão, feita previamente com MDA. O MDA é uma das principais substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico e sendo a concentração final de MDA determinada em µMol/L)

Foram coletados os meios de cinco replicadas biológicas e a peroxidação lipídica do meio de cultivo embrionário está expressa em nanogramas de MDA/mL de meio CIV.

2.9. Análise Estatística

Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 6.0 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA). As porcentagens foram transformadas utilizando arco seno e testados quanto à normalidade (Shapiro-Wilk). As médias foram comparadas com os testes de Tukey (dados paramétricos) ou Kruskal-Wallis (dados não paramétricos). Os resultados estão apresentados por média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e a significância foi considerada quando $P \leq 0,05$.

3. Resultados

A adição de anetol afetou a dinâmica da maturação oocitária. Quando adicionamos 300 $\mu\text{g/mL}$ de anetol no meio MIV não houve diferença nas taxas de MII quando comparado ao grupo controle ($P > 0,05$). Entretanto, a adição de 3000 $\mu\text{g/mL}$ de anetol reduziu significativamente a porcentagem de CCOs que chegaram à metáfase II em relação aos demais grupos ($P < 0,05$; Fig. 3).

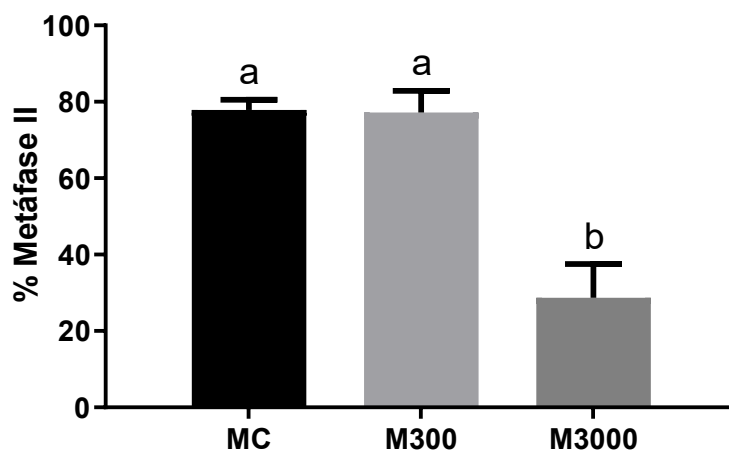


Figura 3. Efeitos da adição de anetol durante a MIV sobre a maturação nuclear de oócitos bovinos. CCOs foram submetidos a MIV em meio controle (MC) acrescido de 300 (M300) ou 3000 $\mu\text{g/mL}$ (M3000) de anetol durante 24 horas ($P < 0,05$). Os dados estão representados por média $\pm$ EPM de 5 réplicas biológicas com 20-25 oócitos por grupo.

Em relação à clivagem, observamos que a adição de 300 $\mu\text{g/mL}$ de anetol durante a MIV e a CIV (M300-C300) aumentou a porcentagem de embriões clivados quando comparado aos demais grupos experimentais ($P < 0,05$; Figura. 4).

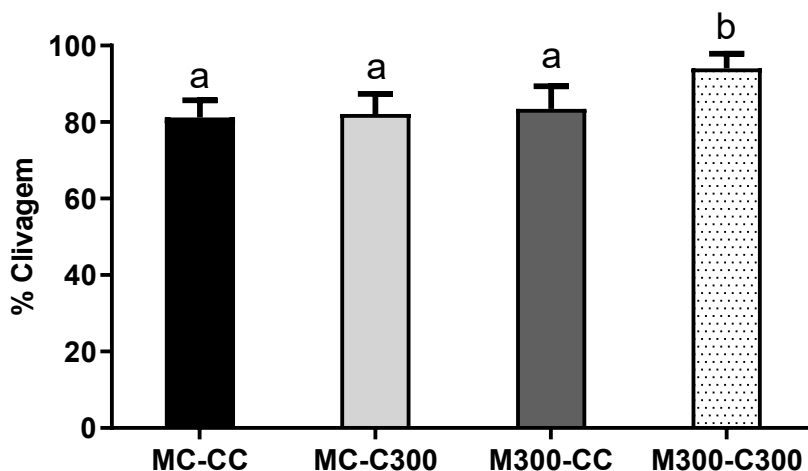


Figura 4. Efeitos da adição de anetol durante a MIV e CIV sobre a clivagem embrionária. CCOs foram submetidos a MIV e CIV em meios controles (MC-CC: MIV e CIV sem anetol) acrescidos ou não de 300 µg/ml de anetol (MC-C300: MIV sem anetol e CIV com anetol; M300-CC: MIV com anetol e CIV sem anetol; M300-C300: 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 ± EPM de 5 réplicas biológicas com 20-25 oócitos por grupo.

Sobre a produção embrionária, nenhuma diferença foi observada entre os grupos ($P > 0,05$; Figura. 5)

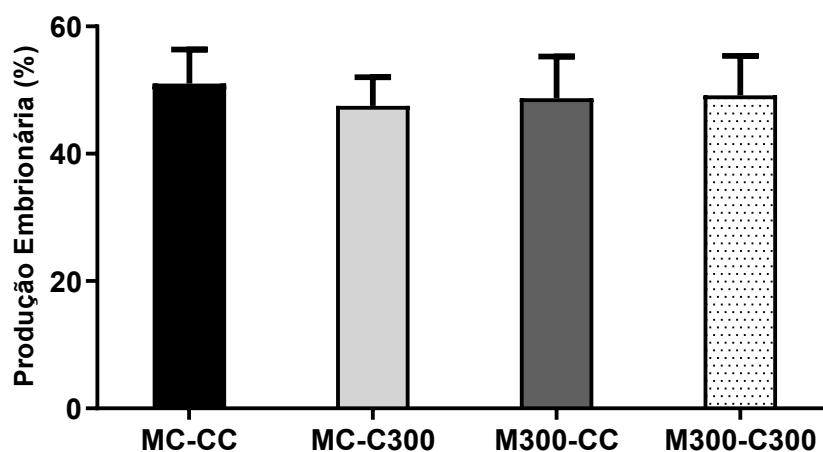


Figura 5. Efeitos da adição de anetol durante a MIV e CIV sobre a produção embrionária. CCOs foram submetidos a MIV e CIV em meios controles (C-C: MIV e CIV sem anetol) acrescidos ou não de 300 µg/ml de anetol (MC-C300: MIV sem anetol e CIV com anetol; M300-CC: MIV com anetol e CIV sem anetol; M300-C300: 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 ± EPM de 5 réplicas biológicas com 20-25 oócitos por grupo.

Além disso, não foi observado diferença sobre a qualidade embrionária, uma vez que a contagem do número total de células embrionárias não se alterou entre os grupos ($P > 0,05$; Figura. 6).

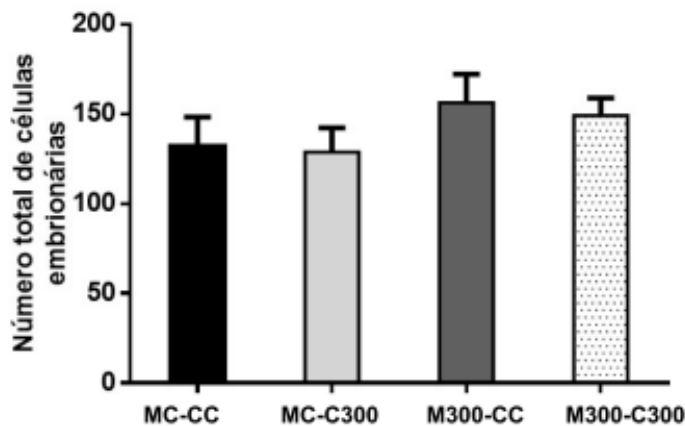


Figura 6. Efeitos da adição de anetol durante a MIV e CIV sobre a qualidade embrionária. CCOs foram submetidos a MIV e CIV em meios controles (MC-CC: MIV e CIV sem anetol) acrescidos ou não de 300 µg/ml de anetol (MC-C300: MIV sem anetol e CIV com anetol; M300-CC: MIV com anetol e CIV sem anetol; M300-C300: MIV e CIV com anetol) durante 24 horas maturação e 7 dias de cultivo. Ao final de 7 dias do cultivo (D8), o número total de células embrionárias foi contado sob microscópio de fluorescência ($P > 0,05$). Os dados estão representados por média ± EPM de 5 réplicas biológicas com 20-25 oócitos por grupo.

O anetol não teve efeitos sobre o estresse oxidativo, pois não observamos diferenças nas concentrações de MDA entre os meios de cultivo embrionário ($P > 0,05$; Figura. 7).

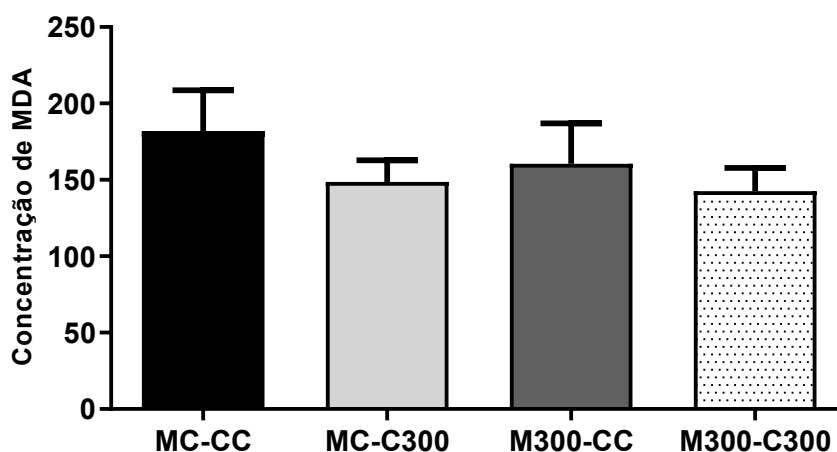


Figura 7. Concentração de malondialdeído (MDA) no meio de cultivo ao final de 7 dias de cultivo embrionário (D8), para avaliar estresse oxidativo através da quantificação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Foram coletados os meios de cinco replicadas biológicas e a concentração final de MDA está expresso em µMol/L ($P > 0,05$).

Os resultados da expressão dos genes *HAS2*, *COX2*, *SOD1*, *GST*, *GREM1*, *CAT* e *CASP3* nas células do *cumulus* encontram-se descritos na Figura 8. A abundância relativa de mRNA dos genes *HAS2* e *COX2* foi maior nos grupos de tratamento, tanto no grupo M300 (300 µg/mL de anetol) quanto no grupo M3000 (3000 µg/mL de anetol; $P < 0,05$). *SOD1* e *CAT* foram mais expressos no grupo M3000 quando comparado ao controle ($P < 0,05$) e os genes *GST* e *GREM1* apresentaram maior expressão no grupo tratado com 300 µg/mL de anetol em comparação com o grupo controle ($P < 0,05$). Já o gene *CASP3* não apresentou diferenças entre os grupos ($P > 0,05$).

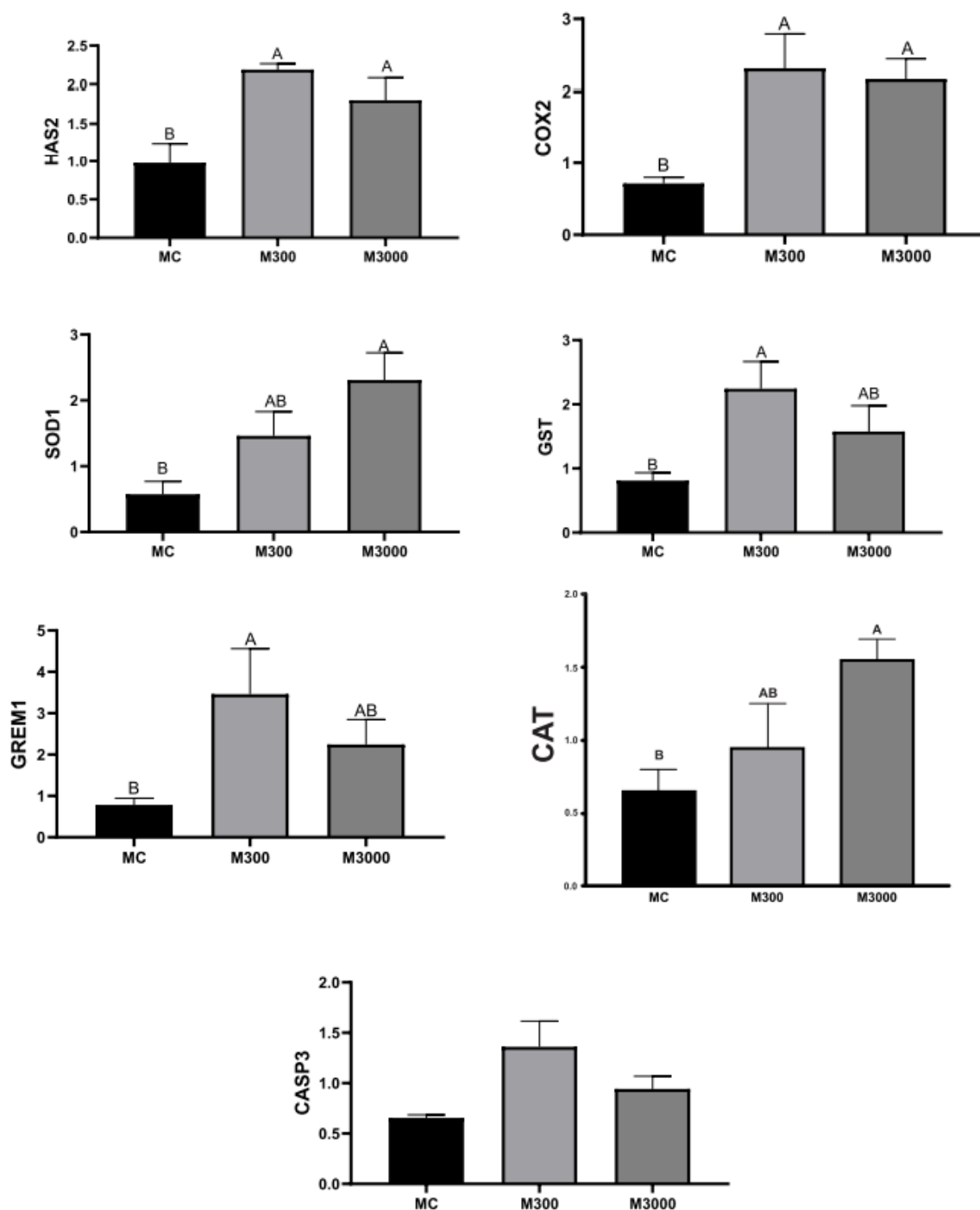


Figura 8. Efeitos do anetol durante a MIV sobre a expressão de genes envolvidos na maturação oocitária, apoptose e estresse oxidativo em células do *cumulus*. CCOs foram submetidos a MIV em meio controle (MC) acrescidos de 300 (M300) ou 3000 $\mu\text{g/ml}$ (M3000) de anetol durante 24 horas. Os dados 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 ($P < 0,05$).

Os resultados da expressão dos genes *GPX1*, *IFNT2A*, *CASP3*, *HSPA1A*, *EGFR*, *ELOVL6* e *PRDX3* nos blastocistos encontram-se descritos na Figura 9. A abundância relativa de mRNA do gene *GPX1* foi maior nos grupos cuja maturação oocitária foi realizada na presença de 300 $\mu\text{g/mL}$ de anetol (M300-CC e M300-C300; $P < 0,05$). Já o *IFNT2A* diminuiu sua expressão com os tratamentos de anetol durante a MIV e CIV (MC-C300, M300-CC e M300-C300), diferindo do grupo controle ($P < 0,05$). *HSPA1A* apresentou menor expressão no grupo tratado com anetol somente na CIV (MC-C300) comparado ao controle ($P < 0,05$). Os genes *CASP3*, *EGFR*, *ELOVL6* e *PRDX3* não apresentaram diferenças entre os grupos ($P > 0,05$).

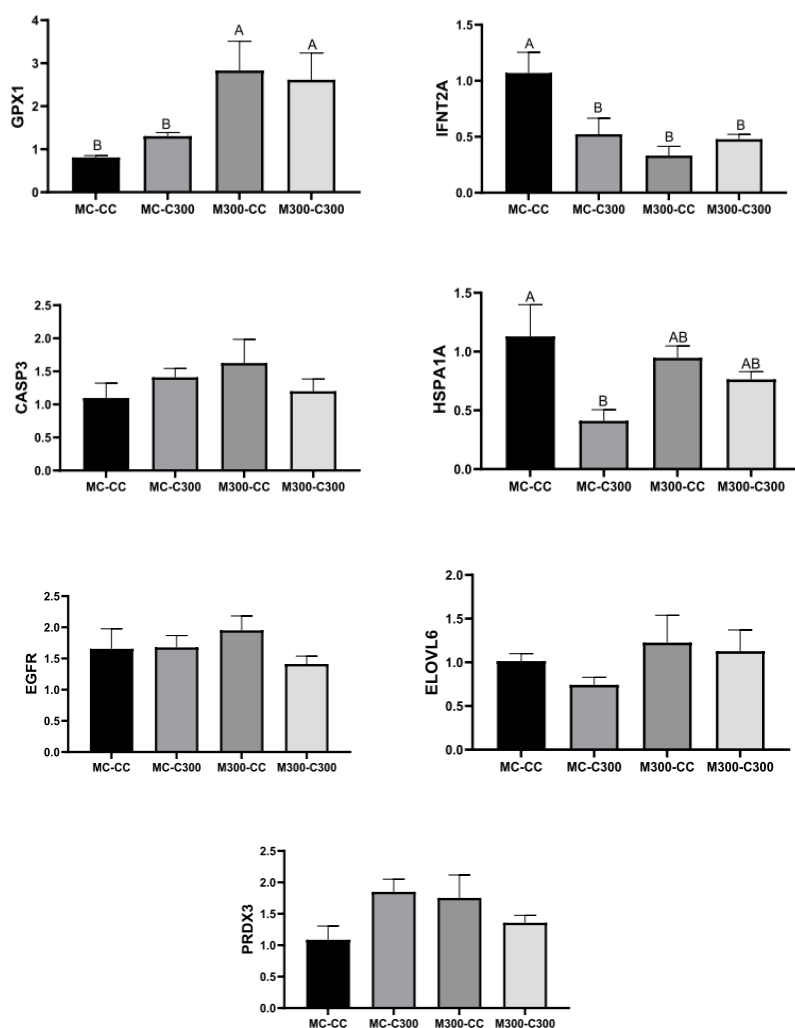


Figura.9. Efeitos do anetol durante a MIV e CIV sobre a expressão de genes envolvidos na qualidade embrionária, apoptose e estresse oxidativo em blastocistos. CCOs foram submetidos a MIV e CIV em meios controles (MC-CC: MIV e CIV sem anetol) acrescidos ou não de 300 µg/ml de anetol (MC-C300: MIV sem 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. 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 ($P < 0,05$).

4. Discussão

Estudos recentes com anetol objetivam investigar o seu efeito sobre a maturação oocitária, produção de blastocistos e qualidade embrionária, além de avaliar seu efeito sobre o estresse oxidativo. No presente estudo, a suplementação do anetol ao meio MIV nas diferentes concentrações (300 e 3000 µg/mL) não resultou em maior número de oócitos que atingiram o estágio de MII, porém a concentração 3000 µg/mL diminui o número de oócitos que atingiram o estágio de MII. Corroborando com isso, Sá e colaboradores [16], Chankitisakul e colaboradores [27] e Furnus e colaboradores [28] observaram resultados semelhantes em seus estudos, uma vez que a adição de antioxidantes, como a L-carnitina, glicina, glutamato, cisteína e o próprio anetol ao meio MIV não apresentou efeitos evidentes sobre a configuração da cromatina do oócito, não havendo diferença entre o grupo tratamento e o grupo controle (sem adição do antioxidante).

Apesar de um estudo recente ter demonstrado que o anetol adicionado durante a MIV não alterou a maturação nuclear de oócitos bovinos em nenhuma das concentrações utilizadas (30, 300, 2000 µg/mL) [16], em nosso estudo o uso de 300 µg/mL de anetol durante a MIV aumentou a taxa de clivagem. Este aumento na taxa de clivagem pode estar associado ao fato de que o anetol estimula a proliferação de células da granulosa, fato que foi observado em folículos secundários isolados de caprinos [10].

Nesse âmbito, mostramos que, embora a adição de 300 µg/mL de anetol não tenha alterado a taxa de MII, o seu uso combinado durante a MIV e CIV aumentou a taxa de clivagem, sugerindo que o anetol promove efeitos benéficos ao desenvolvimento inicial do embrião, corroborando com Chankitisakul e colaboradores [27] e Furnus e colaboradores [28], que observaram melhorias no desenvolvimento embrionário inicial. Furnus e colaboradores [28], relataram que quando os oócitos foram maturados em meio com adição de cisteína, obteve uma maior taxa de clivagem (66%). No estudo de Sá e colaboradores [16] obteve-se uma taxa de clivagem de 68.2% quando adicionado 300µg/mL de anetol e 58.3% quando adicionado 30µg/mL. Em nosso estudo,

conseguimos melhores resultados, uma vez que os oócitos maturados com 300µg/mL apresentaram uma alta taxa de clivagem (94%). Estes achados confirmam que o resultado da MIV reflete no desenvolvimento embrionário, caracterizando, portanto, a MIV como a principal etapa dentro da produção embrionária *in vitro*.

Sobre a produção embrionária neste estudo, mostramos que a adição de 300 µg/mL de anetol durante a MIV e a CIV manteve estável o desenvolvimento e a qualidade embrionária, avaliados pela taxa de blastocistos e a contagem total das células embrionárias. Resultados semelhantes foram encontrados por Furnus e colaboradores [28], que não observaram diferenças entre meio CIV suplementado com aminoácidos constitutivos e meio CIV com cisteamina nas taxas de clivagem, mórulas e blastocisto. Já Sá e colaboradores [16] mostraram que a adição de 30 µg/mL de anetol somente na MIV também não alterou a produção e a qualidade embrionária, entretanto, o uso de 300 µg/mL aumentou a produção de blastocistos e o número total de células embrionárias.

O anetol é um fenilpropanóide que possui propriedades antioxidantes [29], essa substância pode tanto eliminar diretamente EROS, como retardar os processos oxidativos da cadeia [30]. Foi demonstrado por Silva e colaboradores [31], que substâncias com propriedades antioxidantes estão relacionados com a cascata de eventos que levam ao crescimento e diferenciação celular. O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (EROS) e os antioxidantes, fazendo com que ocorra a liberação de uma quantidade excessiva de EROS [15]. Quando estas substâncias se encontram em altas concentrações ocorre a redução de trifosfato de adenosina (ATP), que afeta negativamente o desenvolvimento embrionário *in vitro* [32,33]. Além disso, a formação de EROS provoca a disfunção na atividade mitocondrial, causando danos ao RNA [12,34,35], e DNA, como a fragmentação do material nuclear [36]. A alta concentração de EROS atua ainda na indução da peroxidação lipídica relacionada ao bloqueio da divisão celular [37,38], prejudicando o desenvolvimento de oócitos e embriões [39].

Flohe e colaboradores e Mutoh e colaboradores [40,41], em estudos relacionados a problemas gástricos, corroboram que a glutathiona (GSH), é um poderoso antioxidante que atua eliminando os radicais e inibindo a peroxidação lipídica dos processos mediados por radicais livres. O anetol aumenta os níveis intracelulares de glutathiona, inibindo a peroxidação lipídica, assim a glutathiona reage com uma variedade de hidroperóxidos lipídicos sendo responsável por proteger a membrana celular contra dano oxidativo [42].

No presente estudo avaliamos a capacidade antioxidante do anetol em diferentes concentrações sob o estresse oxidativo na MIV e CIV. O anetol derivado da espécie *Croton zehntineri* possui sete compostos com propriedades antioxidantes dentre eles o composto denominado 3-O-metilquercetina se destaca com alto poder antioxidante, o qual apresenta a atividade antioxidante $IC_{50} 2,76,10^{-3} \pm 9,10^{-5}$ mg/mL [43,44]. De fato, estudos recentes têm evidenciado os efeitos antioxidante do anetol. No cultivo *in situ* de folículos ovarianos pré-antrais, o anetol aumentou significativamente a sobrevivência, ativação, diâmetro oocitário e folicular, bem como reduziu os níveis de EROs exógenas de modo concentração dependente [11]. Ainda, a suplementação de anetol durante a CIV de folículos ovarianos pré-antrais isolados resultou na formação de antro e reduziu significativamente os níveis de EROs exógenas [10]. Em um estudo que avaliou o papel do anetol (300 µg / ml) durante o cultivo *in vitro* de folículos antrais precoces de caprinos mostrou que o anetol reduziu o estresse oxidativo a partir da redução dos níveis de EROs exógenas encontradas no meio de cultivo embrionário, além disso, aumentou o diâmetro oocitário e folicular, a secreção de esteroides e diminuiu a expressão de gene pró-apoptótico (*BAX*), resultando em melhores taxas de maturação (57,7%) e produção de mórulas e blastocistos (10,0%) [45].

Como as espécies de oxigênio reativo tem uma meia vida extremamente curta, sua mensuração direta é difícil. Desta forma, o que pode ser medido são os vários produtos dos danos causados pelo estresse oxidativo, entre eles a peroxidação lipídica medida pelo TBARS [46]. Neste estudo, apesar das evidências dos efeitos antioxidante do anetol, principalmente nas doses do grupo 300 µg/ml na MIV e no CIV, o teste de TBARS realizado no meio de produção de embriões não apresentou significância estatística.

Apesar disso, a análise de genes relacionados ao metabolismo celular em resposta ao estresse oxidativo, mostrou elevação de sua abundância quando foi utilizado o anetol. Nas CCs, o gene *SOD 1* e *CAT* apresentaram expressão crescente nos grupos maturados com anetol. O gene *SOD 1* catalisa e converte o ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$), em um produto menos reativo, a H_2O_2 , que é eliminado pela catalase (*CAT*) e pela glutathione redutase (*GSR*). Desta forma a elevação da abundância destes transcritos demonstra a contribuição do anetol para a neutralização do efeito das EROS. Apesar disso, o grupo tratado com 3000 µg/mL de anetol apresentou menores valores de taxa de MII e de produção embrionária quando utilizado tanto na maturação quanto no cultivo. É conhecido que apesar do excesso de EROS ser nocivo as células, estas moléculas também participam, como sinalizadores, em diversas reações do ciclo celular. Sendo assim, a redução

excessiva de EROS poderia levar ao comprometimento de funções biológicas importantes como a evolução da maturação oocitária e o desenvolvimento embrionário [47].

Por outro lado a expressão do gene GST encontrou-se em maior abundância nas células do cumulus do grupo tratado com 300 µg/mL de anetol, indicando um efeito benéfico da adição desta concentração durante a MIV, o que foi confirmado pelos bons índices de produção embrionária observados nos grupos onde o anetol foi utilizado durante a maturação.

O *HAS2* e *COX2* controlam a síntese de ácido hialurônico e prostaglandina (PGE2) respectivamente, sendo que o gene *COX2* está relacionado ao desenvolvimento e maturidade de oócitos e o gene *HAS2*, induzido após o pico de LH, é essencial para que ocorra uma boa expansão das CCs [48]. Em nosso estudo, estes genes também apresentaram maior expressão nos grupos tratados com anetol (M300 ou M3000 µg/mL). De acordo com isto, apesar de não observarmos diferenças visíveis na expansão das CCs e efeitos positivos do anetol nos índices de maturação nuclear, sua adição poderia influenciar o metabolismo das CCs e assim promover uma melhor competência oocitária.

Com relação ao controle do estresse oxidativo em embriões, o gene *GPXI*, cujo produto catalisa a redução do peróxido de hidrogênio pela glutathione, apresentou uma maior expressão nos tratamentos onde o anetol foi utilizado durante a MIV, tanto no grupo M300-CC quanto M300-C300, indicando um efeito positivo do anetol como antioxidante. Isto está de acordo com o descrito na literatura, onde o efeito antioxidante do anetol se deve a capacidade de inibir a peroxidação lipídica e induzir a síntese de catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase reduzindo assim os EROs [49,50]. Já se comprovou que anetol apresenta propriedades protetoras contra a toxicidade induzida pelo peróxido de hidrogênio evitando a apoptose celular. Além de que o anetol existe a qualidade lipofílica que permeia as membranas celulares facilmente [29].

Em um estudo que investigou os efeitos do anetol durante a MIV na dosagem de 300 µg / ml, e na PIV nas dosagens 30, 300 ou 2000 µg / ml, foi constatado um efeito positivo nas taxas de blastocistos na suplementação de meio de PIV com 30 µg/ml de anetol (35,7%) comparado ao grupo controle (25,4%) [51]. Por outro lado, os mesmos autores constataram que a suplementação de anetol na MIV não afetou as taxas de embriões de 2-4 células [51]. Este resultado discorda do presente experimento, onde melhores taxas de clivagem foram observadas no grupo tratado com anetol na MIV e na PIV. Da mesma forma, as maiores taxas de produção de blastocistos foram observadas no grupo que recebeu suplementação de anetol, tanto na MIV quanto na PIV M300 – C300). Apesar

disso, não foi observado diferença em relação ao grupo controle. Talvez, em um sistema otimizado, com mais de 40% de produção de blastocistos, como o do presente experimento, os benefícios da adição de agentes antioxidantes como o anetol não fiquem tão evidentes.

Anjos e colaboradores [51] alertam que o anetol apóia a síntese de glutathione (GSH) para neutralizar o estresse oxidativo. A GSH é um agente redutor da homocisteína que por sua vez medeia a maturação oocitária e a produção dos pronúcleos após a fertilização. Desta forma estes autores recomendam a utilização do anetol durante a fase inicial de PIV. Entretanto, No presente experimento, a adição de anetol durante a MIV resultou em taxas de produção de blastocistos compatíveis com as dos grupos onde o anetol foi adicionado somente na PIV.

Embora existam evidências de um efeito benéfico do anetol tanto durante o preparo do oócito para a fertilização quanto durante o desenvolvimento embrionário, os genes *IFNT2* e *HSPA1A* que estão relacionados a qualidade embrionária, apresentaram menor expressão nos grupos de tratamento com anetol. As razões para este achado não são conhecidas, uma vez que as taxas de produção de blastocistos e a contagem do número de células no embrião são semelhantes entre os grupos produzidos em presença ou ausência de anetol.

Apesar da semelhança estatística entre os grupos sem tratamento e com adição do anetol (M300), a maior abundância relativa dos genes *GREM1*, *HAS2*, *COX2*, *SOD1* na maturação oocitária em presença de anetol indica modulação do estresse oxidativo e do desenvolvimento oocitário, o que pode auxiliar no melhor desenvolvimento embrionário. A aplicabilidade prática do conhecimento adquirido neste estudo é bastante relevante, uma vez que o estresse oxidativo ainda é o principal fator limitante para a expansão da PIV. Os resultados do presente experimento demonstram que o anetol é uma alternativa antioxidante de baixo custo com alto nível de eficiência e eficácia na redução do estresse oxidativo, que garante uma alta produção de blastocistos com boa qualidade embrionária.

5. Conclusão

Em conclusão, o presente estudo mostrou 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 embrião.

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 Wagendonk-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, Cibir 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.cbpa.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, Smits 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, Cibir 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.