

## EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO COM DIFERENTES ANTIOXIDANTES DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS SOBRE O *STATUS* OXIDATIVO

(*Effects of medium supplementation with different antioxidants during in vitro maturation of bovine oocytes on oxidative status*)

Lhara Ricarliany Medeiros de OLIVEIRA<sup>1\*</sup>; Leonardo Vitorino Costa de AQUINO<sup>1</sup>; Maria Valéria de Oliveira SANTOS<sup>1</sup>; Luciana Medeiros BERTINI<sup>2</sup>; Alexsandra Fernandes PEREIRA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biotecnologia Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Av. Francisco Mota, 572, Mossoró/RN. CEP: 59.625-900; <sup>2</sup>Instituto Federal do Rio Grande do Norte.

\*E-mail: [lharagirs@hotmail.com](mailto:lharagirs@hotmail.com)

### ABSTRACT

Although widely used as reproductive biotechnology in cattle, *in vitro* embryo production (IVEP) has variable efficiency. During *in vitro* maturation (IVM), supplementing the medium with antioxidant potential could be an affordable alternative to increase the efficiency of IVEP, requiring the evaluation of new components, such as eugenol,  $\beta$ -caryophyllene, and acetyl eugenol. Thus, bovine oocytes were matured according to different antioxidants. Metaphase II oocytes were identified by Hoechst staining. The oxidative status was measured by evaluation of reactive oxygen species (ROS), and glutathione (GSH). After eight repetitions, no difference was observed among groups containing antioxidants, being all these groups superior to negative control ( $p < 0.05$ ). The ROS levels decreased and GSH increased in oocytes matured with EUG ( $p < 0.05$ ). These results indicate a positive effect of eugenol on the oxidative status of oocytes matured with this compound, showing that eugenol can be an efficient supplement in the IVM of bovine oocytes.

**Key words:** *In vitro* embryo production, oxidative homeostasis, cattle.

### INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* embriões (PIVE) em bovinos apresenta uma eficiência variável, com taxas de 70–90% de maturação *in vitro* (MIV), 50–80% de fecundação *in vitro* (FIV) e 20–40% na produção de blastocistos (KIM *et al.*, 2019). Essas variações podem estar relacionadas a injúrias relacionadas ao ambiente *in vitro*, tais como atmosfera gasosa, temperatura, suplementação do meio e manipulação de oócitos (SOVERNIGO *et al.*, 2017). Nessas condições, espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas (SANTOS *et al.*, 2019). O desequilíbrio dessas moléculas pode gerar o estresse oxidativo, estado que prejudica drasticamente a qualidade do cultivo (KIM *et al.*, 2019).

Para denotar esse fenômeno *in vitro*, a avaliação do *status* oxidativo dos oócitos é aplicada, pois ela demonstra as condições de estresse oxidativo, conforme expresso pelo aumento dos níveis de EROs, seguido por menor presença de glutathione (GSH) (MASTROROCCO *et al.*, 2019). Quando negativo, este *status* pode induzir danos funcionais, tanto nos oócitos quanto no desenvolvimento embrionário.

Assim, o uso de antioxidantes na MIV é um passo necessário para garantir o equilíbrio do *status* oxidativo oocitário, aumentando as taxas de reprodução por meio da aplicação eficiente da PIVE (SOVERNIGO *et al.*, 2017). Diversas substâncias derivadas de

plantas têm sido investigadas. Recentemente, o grupo LBA/UFERSA demonstrou o efeito antioxidante do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* em oócitos bovinos (SANTOS *et al.*, 2019). Neste estudo, foi demonstrado que 20µg/mL do óleo promoveu uma redução do estresse oxidativo e melhorou o desenvolvimento embrionário.

A partir deste estudo, se tem agora avaliado os constituintes isolados (eugenol, β-cariofileno e acetato de eugenila) deste óleo com o intuito de identificar como essas substâncias atuam na redução do estresse oxidativo oocitário. Portanto, o trabalho teve como objetivo fornecer um melhor entendimento da capacidade antioxidante do eugenol, β-cariofileno e acetato de eugenila durante a MIV de oócitos bovinos, gerando uma maior reprodutibilidade e eficiência na PIVE.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Bioética e isolamento dos antioxidantes

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA/UFERSA nº 23091.002360/2016-17). Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA/UFERSA). Inicialmente, as substâncias avaliadas (eugenol, β-cariofileno e acetato de eugenila) foram isoladas do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* e purificadas após tratamentos cromatográficos. Concentrações destas substâncias foram estabelecidas proporcionalmente à composição química presente em 20µg/mL do óleo de Santos *et al.* (2019).

### Recuperação, seleção e maturação *in vitro* oocitária (MIV)

Para os experimentos, ovários de animais de abatedouro foram transportados ao laboratório em NaCl 0,9% a 35–37 °C. Folículos ovarianos (2–8mm) foram aspirados usando agulha e seringa (21G/5mL) contendo meio de seleção oocitária (MSO; TCM199–HEPES com 0,2mM de piruvato de sódio, 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico).

Após a recuperação oocitária, estruturas com três camadas completas de células do *cumulus* e citoplasma uniforme foram selecionados para a MIV. Oócitos foram divididos em cinco grupos: (i) sem antioxidante (grupo controle negativo), (ii) 100µM de cisteamina (grupo controle positivo), (iii) 13,7µg/mL de eugenol, (iv) 3,9µg/mL de β-cariofileno, e (v) 2,4µg/mL de acetato de eugenila. Todos os oócitos foram maturados por 24 h, a 38,5 °C e 5% CO<sub>2</sub> em meio MSO acrescido de 20mg/mL FSH/LH e os diferentes antioxidantes de acordo com os grupos experimentais.

### Avaliação da MIV e do *status* oxidativo

Após a MIV, oócitos foram avaliados quanto à presença do núcleo em metáfase II usando Hoechst 33342. Brevemente, oócitos foram desnudos usando 0,1% de hialuronidase, e marcados com 10µg/mL de Hoechst 33342 por 15min. Após esse período, oócitos foram visualizados em microscópio de fluorescência, sendo considerados maturados aqueles apresentando o núcleo em metáfase II (MII) (Santos *et al.*, 2019).

Já para avaliação do *status* oxidativo, oócitos desnudos foram submetidos a duas marcações fluorescentes para avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e

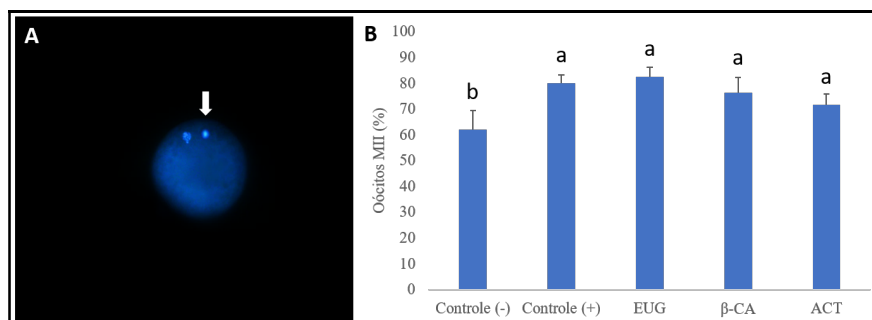
níveis de glutathiona (GSH). Brevemente, EROs foram quantificados utilizando a sonda diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA; 10µM). Em seguida, fotografados sob microscópio de fluorescência para quantificar a intensidade do sinal de fluorescência (pixels) utilizando o software ImageJ. Já para detectar os níveis de GSH, oócitos foram incubados em CellTracker Blue (CMF<sub>2</sub>HC; 10µM). A avaliação das imagens de GSH foi realizada conforme descrito para a quantificação de EROs. O grupo sem antioxidantes (controle negativo) foi usado como calibrador e os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (SOVERNIGO *et al.*, 2017).

### Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média±erro padrão de oito repetições e foram analisados usando o software StatView 5.0. Os níveis de EROs, e GSH foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey. Todos os outros dados foram comparados usando teste qui-quadrado ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

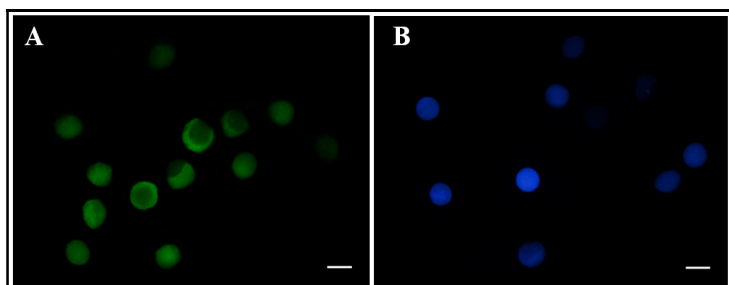
Após oito repetições, um total de 176 ovários foram obtidos, resultando em 712 estruturas viáveis, perfazendo uma média de 4,3 oócitos viáveis/ovário. Quanto ao percentual de oócitos maturados (Fig. 01A), nenhuma diferença foi observada entre os grupos contendo antioxidantes ( $p > 0,05$ ). Contudo, todos esses grupos difeririam do controle negativo ( $p < 0,05$ ), evidenciando um efeito positivo de todas as substâncias testadas sobre a habilidade meiótica (Fig. 01B). A condensação cromossômica consiste no primeiro evento visível na maturação meiótica e é importante para a formação dos cromossomos e suas segregações adequadas. Portanto, a adição dessas substâncias antioxidantes pode ter otimizado esse fenômeno, podendo influenciar na qualidade dos embriões (KIM *et al.*, 2019).



**Figura 01:** Avaliação dos antioxidantes na MIV de oócitos bovinos. (A) oócito em MII com 1CP (seta). (B) Taxas MIV. <sup>a,b</sup>. letras indicam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

O *status* oxidativo foi avaliado usando tanto a mensuração dos níveis de EROs (Fig. 02A), quanto os níveis de GSH (Fig. 02B). No que se refere aos níveis de EROs, estes foram menores em oócitos maturados na presença de cisteamina (CIS) e eugenol (EUG) quando comparados aos oócitos maturados na ausência de antioxidante (controle negativo, Tab. 01). Durante a produção de ATP na cadeia respiratória celular, as EROs são produzidas como subproduto do metabolismo celular por meio da fosforilação oxidativa, sendo essa a principal

fonte de EROs nos oócitos (BARROS *et al.*, 2019). Portanto, nós podemos correlacionar que a menor produção de EROs nos grupos maturados com EUG e CIS, está associada a uma maior qualidade oocitária.



**Figura 02:** Imagens de oócitos marcados com as sondas (A) H<sub>2</sub>DCFDA para mensuração de EROs. (B) CellTracker Blue para mensuração de GSH. Barra de escala = 200 µm.

**Tabela 01:** Níveis intracelulares de EROs e (GSH) expressos em unidades arbitrárias de fluorescência de oócitos bovinos maturados com diferentes antioxidantes.

Grupos	EROs	GSH
Controle negativo	1,00±0,87 (52) <sup>b</sup>	0,46±0,12 (55) <sup>c</sup>
Controle positivo (CIS)	0,33±0,16 (52) <sup>a</sup>	1,00±0,34 (68) <sup>a</sup>
EUG	0,27±0,11 (58) <sup>a</sup>	0,99±0,37 (66) <sup>a</sup>
β-CA	0,44±0,13 (59) <sup>ab</sup>	0,65±0,17 (63) <sup>bc</sup>
ACT	0,36±0,12 (49) <sup>ab</sup>	0,78±0,13 (60) <sup>b</sup>

<sup>a,b,c</sup>: indicam diferença estatística entre os grupos experimentais (Pp0,05).

Os níveis de GSH (Tab. 01) em oócitos foram maiores ( $p < 0,05$ ) em ambos os grupos CIS e EUG durante MIV em comparação com outros grupos. Além disso, os menores níveis de intensidade foram observados no grupo controle negativo ( $p < 0,05$ ). A glutathiona é o principal antioxidante em células de mamíferos, e tem como função proteger as células contra o dano oxidativo por meio da redução de EROs (KIM *et al.*, 2019). Pode-se verificar que a adição de EUG e CIS resultou em um aumento significativo nos níveis de GSH, indicando efeitos positivos para oócitos bovinos durante a MIV.

## CONCLUSÕES

O presente trabalho mostrou que o uso de eugenol como suplementação no meio de maturação de oócitos bovinos aumentou as taxas de maturação nuclear, além de desempenhar um papel na conservação do estado oxidativo dos oócitos, reduzindo os níveis de EROs e aumentando o GSH intracelular.

## REFERÊNCIAS

- BARROS, F.D.A.; ADONA, P.R.; GUEMRA, S.; DAMIÃO, B.C.M. Oxidative homeostasis in oocyte competence for *in vitro* embryo development. *Animal Science Journal*, v.90, p.1343–9, 2019.
- KIM, W.J.; LEE, S.E.; PARK, Y.G.; JEONG, S.G.; KIM, E.Y.; PARK, S.P. Antioxidant hesperetin improves the quality of porcine oocytes during aging *in vitro*. *Molecular Reproduction Development*, v.86, p.32–41, 2019.
- MASTROROCCO, A., MARTINO, N.A.; MARZANO, G.; DELL'AQUILA, M.E.; MIVERVINI, F. The mycotoxin beauvericin induces oocyte mitochondrial dysfunction and affects embryo development in the juvenile sheep. *Molecular Reproduction Development*, v.86, p.1430–43, 2019.
- SANTOS, M.V.O.; NASCIMENTO, L.E.; PRAXEDES, E.A.; SILVA, A.R.; BERTINI, L.M.; PEREIRA, A.F. *Syzygium aromaticum* essential oil supplementation during *in vitro* bovine oocyte maturation improves parthenogenetic embryonic development. *Theriogenology*, v.128, p.74–80, 2019.
- SOVERNIGO, T.C.; ADONA, P.R.; MONZANI, P.S.; GUEMRA, S.; BARROS, F.D.A.; LOPES, F.G.; LEAL, C.L. Effects of supplementation of medium with different antioxidants during *in vitro* maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. *Reproduction in Domestic Animals*, v.52, p.561–9, 2017.