



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

NAIZA ARCÂNGELA RIBEIRO DE SÁ

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO ANETOL NA FOLICULOGÊNESE E NA
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES**

FORTALEZA – CEARÁ

2019

NAIZA ARCÂNGELA RIBEIRO DE SÁ

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO ANETOL NA FOLICULOGÊNESE E NA
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Ciências Fisiológicas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Instituto Superior de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora em Ciências fisiológicas. Área de concentração: Fisiologia da Reprodução.

Orientador: Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo.

FORTALEZA – CEARÁ

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Sá, Naiza Arcângela Ribeiro de .
AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO ANETOL NA
FOLICULOGÊNESE E NA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES
[recurso eletrônico] / Naiza Arcângela Ribeiro de Sá.
- 2019.
1 CD-ROM: il.; 4 * pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do
trabalho acadêmico com 142 folhas, acondicionado em
caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm).

Tese (doutorado) - Universidade Estadual do
Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Fisiológicas, Fortaleza, 2019.
Área de concentração: Fisiologia da Reprodução.
Orientação: Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo.

1. Espécies reativas de oxigênio. 2. Folículo pré-
antral. 3. Ócito. 4. Anetol. 5. Antioxidante. I.
Título.

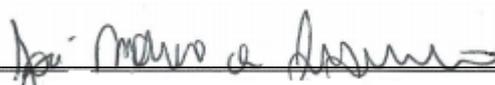
NAIZA ARCÂNGELA RIBEIRO DE SÁ

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO ANETOL NA FOLICULOGÊNESE E NA
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Ciências Fisiológicas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Instituto Superior de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora em Ciências fisiológicas. Área de concentração: Fisiologia da Reprodução.

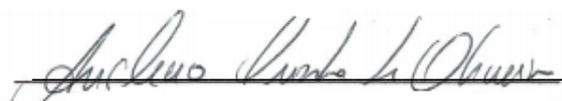
Apresentada em: 20 de fevereiro de 2019

Banca Examinadora:


Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo

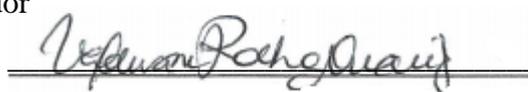
Universidade Estadual do Ceará - UECE

Orientador


Prof. Dr. Ariclécio Cunha de Oliveira

Universidade Estadual do Ceará – UECE

Examinador


Profa. Dra. Valdevane Rocha Araújo

Universidade Estadual do Ceará – UECE

Examinador



Prof. Dr. Eduardo Leite Gastal

Southern Illinois University (EUA)

Examinador



Dr. Luis Alberto Vieira

University of Murcia (Espanha)

Examinador

Porque dEle, por meio dEle e para Ele, são todas as coisas.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Ceará (UECE) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PPGCF), aos professores e aos funcionários por esses anos colaborando com minha formação profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos durante a realização do curso de doutorado, fato este que muito contribuiu para a viabilização desta tese.

Ao Laboratório de Manipulação de Oócitos inclusos em Folículos Pré-Antrais (LAMOFOPA) da vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) da UECE, por dar-me todo o suporte para a realização dessa tese.

À banca examinadora, por aceitar o convite e, sobretudo pela sua preciosa colaboração ao corrigir este trabalho.

Ao Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo pela orientação, incentivo, disponibilidade e pelo saber que transmitiu. Por compartilhar além dos seus conhecimentos científicos, os cristãos, isso me fez ver o papel do pesquisador por um novo ângulo.

Aos meus co-orientadores e amigos, Dra. Jamily Bezerra Bruno, Dra. Carolina Maside Mielgo, Dr. Luis Alberto Vieira e Dra Francisca Geovania Canafístula de Souza pelos ensinamentos e ótimos momentos compartilhados. Vocês foram essenciais durante essa caminhada. Obrigada pelas palavras, ensinamentos, incentivo e atenção dispensada no decorrer desse período. É difícil expressar em palavras o meu carinho, amizade e admiração por cada um de vocês!

À equipe executora desse trabalho e a todas as pessoas que me ajudaram em toda essa jornada: Anna Clara Accioly, Ana Beatriz Graça Duarte, Carolina Maside, Denise Guerreiro, Francisca Geovania Canafístula, Jamily Bruno, Jesús Cadenas, Luís Alberto Vieira, Victor Macêdo, Jefferson Castro, Renato Félix, Gabriel de Las Heras, Benner Geraldo Alves, Rafael Rossetto e César Fernandes. Obrigada por não terem desistido dos intermináveis testes e experimentos, principalmente pelas muitas risadas durante as longas horas de trabalho na sala de cultivo. Em especial à Anna Clara, agradeço pela parceria durante esses 6 anos. Sua amizade tornou o fardo mais leve! Ao Jesús Cadenas, minha dupla hispano-brasileira, e ao Victor Macêdo por todos os momentos de descontração, questionamento e de aprendizagem. Obrigada por todos os momentos que passamos juntos, sem vocês não teria sido possível executar essa tese!

À Dra Valdevane Rocha Araújo e ao Dr. Francisco Léo de Nascimento Aguiar pela amizade, carinho e por estarem sempre disponíveis a me ajudar em tudo quanto precisei.

A todos os amigos da equipe do LAMOFOPA, pelos momentos que compartilhamos durante todos esses anos. Cada um teve sua importante parcela de contribuição na transformação do laboratório na minha segunda casa, às vezes a primeira.

À minha família, a base mais sólida de sustentação que eu poderia ter. Agradeço pelo apoio, carinho e compreensão durante esses anos em que estive ausente. Agradeço especialmente aos meus pais, Socorro Ribeiro e Ribamar Sá, pelo exemplo, confiança, amor e apoio incondicional, às minhas irmãs Nálida Lorena e Ana Carolina, por terem vindo morar comigo, tornando meus dias mais tranquilos e essa jornada mais suportável e à minha prima Betânia Sá que me alegrou e incentivou durante todas as nossas conversas. Sem vocês não teria chegado aqui, esse doutorado também é de vocês.

À Deus, por me guiar de acordo com Sua vontade. Por me mostrar que Ele tem os melhores planos e que tudo está sob Seu domínio. Por ter me sustentado e me mostrado que eu nada seria sem Ele. Por sempre estar comigo, por me dar forças para enfrentar minhas limitações, meus medos, meu cansaço e me fazer seguir em frente quando nada parecia acontecer. Obrigada Pai, por iluminar o meu caminho para o término de mais uma etapa.

Enfim, o meu muito obrigada a todos os que contribuíram de alguma maneira para que esse trabalho fosse realizado, ou que torceram e oraram pelo meu êxito. Muito obrigada!

"Sabemos que todas as coisas cooperam para o bem daqueles que amam a Deus, daqueles que são chamados segundo o seu propósito".

(Romanos 8:28).

RESUMO

Os objetivos foram: Capítulo I) avaliar os efeitos de diferentes concentrações de anetol no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprino inclusos no tecido ovariano (*in situ*); Capítulo II) estudar o efeito da adição de anetol sobre o cultivo *in vitro* de folículos antrais iniciais (FAI) caprinos cultivados na forma isolada; Capítulo III) investigar o impacto da suplementação de anetol em meio de maturação *in vitro* (MIV) sobre a retomada da meiose de oócitos bovino e desenvolvimento embrionário. No Capítulo I, fragmentos ovarianos foram fixados imediatamente (controle não cultivado) ou distribuídos aleatoriamente em cinco tratamentos: α -MEM⁺ (controle cultivado), α -MEM⁺ suplementado com 50 μ g/mL de ácido ascórbico (AA), ou anetol a 30 (AN30), 300 (AN300) ou 2000 μ g/mL (AN2000), durante 1 ou 7 dias. No Capítulo II, FAI foram isolados e cultivados por 18 dias na ausência (controle) ou presença de anetol (300 μ g/mL). Já no Capítulo III, oócitos foram maturados em TCM199⁺ (tratamento controle) ou TCM199⁺ suplementado com anetol nas concentrações de 30 (AN30), 300 (AN300) e 2000 μ g/mL (AN2000) por 24 horas. No Capítulo I, após 7 dias de cultivo, foi observado um percentual superior ($P < 0,05$) de folículos morfologicamente normais quando o AN2000 foi usado. O anetol nas concentrações de 30 e 2000 μ g/mL nos dias 1 e 7 de cultivo resultou em diâmetro folicular maior ($P < 0,05$) do que no tratamento controle cultivado. No dia 7 de cultivo, o AN30 foi único capaz de reduzir ($P < 0,05$) os níveis de EROs no meio de cultivo quando comparado aos demais tratamentos. No Capítulo II, o anetol melhorou as taxas de retomada da meiose, metáfase II e desenvolvimento embrionário, bem como seu efeito sobre o aumento do poder antioxidante de redução do ferro e redução na expressão de genes apoptóticos ($P < 0,05$). Além disso, este estudo relatou, pela primeira vez, uma prenhez caprina após fertilização *in vitro* de oócitos derivados de FAI cultivados *in vitro*. No Capítulo III, o percentual de oócitos em MII foi semelhante ($P > 0,05$) entre os tratamentos (intervalo, 77–96%). O anetol a 300 μ g/mL foi o único tratamento que resultou em maiores ($P < 0,05$) taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário (mórula e blastocisto) em comparação ao tratamento controle. Oócitos tratados com AN300 apresentaram maior ($P < 0,05$) FRAP e potencial de membrana mitocondrial em comparação ao controle. Além disso, o AN300 aumentou ($P < 0,05$) o número médio de células totais nos blastocistos em comparação ao controle e AN30. Em conclusão, a suplementação de meio de cultivo com anetol melhorou a sobrevivência e o desenvolvimento folicular precoce em diferentes concentrações. Além disso, a adição de anetol melhora o crescimento e maturação *in vitro* de oócitos derivados de FAI caprinos associado a um impacto positivo sobre a produção embrionária *in vitro*, resultando

inclusive na produção de uma prenhez. E, adicionalmente, sugere-se o uso de anetol a 300 µg/mL durante a MIV melhorando a quantidade e qualidade de embriões produzidos *in vitro*.

Palavras-chave: Espécies reativas de oxigênio. Folículo pré-antral. Oócito. Anetol. Antioxidante.

ABSTRACT

The aims were: Chapter I) to evaluate the effect of different anethole concentrations on the *in vitro* culture of caprine preantral follicles enclosed in ovarian tissue (*in situ*); Chapter II) to study the effect of the addition of anethole on *in vitro* culture of early antral follicles (EAF) goats isolated; and Chapter III) to investigate the impact of anethole supplementation to *in vitro* maturation (IVM) media on the resumption of bovine oocyte meiosis and embryonic development. Chapter I, ovarian fragments were fixed immediately (noncultured control) or distributed into five treatments: α -MEM⁺ (cultured control), α -MEM⁺ supplemented with ascorbic acid at 50 μ g/mL (AA), anethole at 30 (AN30), 300 (AN300), or 2000 μ g/mL (AN2000), for 1 or 7 days. For Chapter II, EAFs were isolated and cultured for 18 days in the absence (control) or presence of anethole (300 μ g/mL). Already for the Chapter III, oocytes were matured in TCM199⁺ (control treatment) or TCM199⁺ supplemented with anethole at concentrations of 30 (AN30), 300 (AN300), and 2000 μ g/mL (AN2000) for 24 hours. In the Chapter I, were demonstrated that after 7 days of culture, highest ($P < 0.05$) percentage of morphologically normal follicles was observed when anethole at 2000 μ g/mL was used. Anethole at 30 and 2000 μ g/mL concentrations at days 1 and 7 of culture resulted larger ($P < 0.05$) follicular diameter than in the cultured control treatment. At day 7 of culture, reactive oxygen species levels were lower ($P < 0.05$) in the AN30 treatment than the other treatments. Regarding the results of Chapter II, Anethole positively affected oocyte maturation and embryo development, as well as increased the ferric reducing antioxidant power, and downregulated the expression of pro-apoptotic genes ($P > 0.05$). Furthermore, this study reported, for the first time, one caprine pregnancy after IVF of oocytes derived from EAFs grown *in vitro*. In Chapter III, the percentage of MII oocytes were similar ($P > 0.05$) among the treatments (range, 77–96%). Anethole at 300 μ g/mL was the only treatment that yielded higher ($P < 0.05$) cleavage and embryo development (morula and blastocyst) rates compared to the control treatment. Oocytes treated with AN300 had higher ($P < 0.05$) FRAP and mitochondrial membrane potential compared with the control treatment. Furthermore, AN300 treatment increased ($P < 0.05$) the average number of total cells in blastocysts compared to the control and AN30 treatments. In conclusion, supplementation of culture medium with anethole improves survival and early follicle development in different concentrations. Besides, anethole improved growth and maturation of goat oocytes when added during the *in vitro* culture of isolated EAFs. Also, it had a positive impact on *in vitro* embryo production, even producing one pregnancy. And,

additionally, the use of anethole at 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ during IVM is suggested to improve the quantity and quality of embryos produced *in vitro*.

Key-words: Reactive oxygen species. Pre-antral follicle. Oocyte. Anethole. Antioxidant.