

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CÂMPUS SÃO LUÍS DE MONTES BELOS, GO
PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO RURAL SUSTENTÁVEL
MESTRADO PROFISSIONAL

PATRICIA FERNANDA PEIXER

**UTILIZAÇÃO DO ÁCIDO ASCÓRBICO NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES
BOVINOS**

São Luís de Montes Belos - GO

2019

PATRICIA FERNANDA PEIXER

**UTILIZAÇÃO DO ÁCIDO ASCÓRBICO NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES
BOVINOS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Goiás Câmpus São Luís de Montes Belos para obtenção do título de Mestre em Desenvolvimento Rural Sustentável.

Linha de pesquisa: Produção Animal

Orientador: Prof. Dr. Klayto José Gonçalves dos Santos

São Luís de Montes Belos, GO
2019

DEDICATÓRIA

Ao meu irmão Jaison Valdir Peixer (*In- Memoriam*)
dedico todo esforço que tive para finalizar esse
trabalho, que se faz presente em todos os dias da
minha vida, que não pôde vivenciar esse momento,
mas que batalhou ao meu lado até a sua partida, e que
tem olhado por mim todos os dias!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus por manter um olhar generoso sobre mim e minha vida, e por tudo que alcancei até hoje, pois a vida tem ocupado meus dias com novos e grandes desafios, e é graças a Deus que tenho ultrapassado todos eles com dedicação e amor, e sei que sem Ele nada conseguiria!

Aos meus pais Aloir Peixer e Neuza Dias, pela vida, amor e apoio incondicionais. Pela luta em sempre nos fornece o melhor em tudo, principalmente na educação, privando-os de seus próprios sonhos. Amo muito vocês!

Aos meus irmãos Jaison (*in memorian*) e Geovana, pelo apoio, carinho e pelas várias brigas que tivemos quando morávamos juntos, acredito que de alguma maneira fez com que crescêssemos mais, e a manter o carinho, respeito e seguirmos sempre admirando e amando um ao outro, e foi necessário a distância para percebermos que de alguma maneira ou outra sempre iríamos precisar um do outro.

A toda minha família em si, sou grata por terem vocês em minha vida, e pela quantidade de amor que vocês sempre me deram.

Ao meu orientador Professor Dr. Klayto Gonçalves dos Santos, pela oportunidade e ensinamentos, com quem aprendi tanto e possuo grande admiração.

Aos meus amigos mineiros, Janaina, Fernando, Gabriel e Larissa, qualquer pessoa seria sortuda por ter um só de vocês como amigo e de alguma forma acabei tendo todos vocês! Sou muito grata por ter feito parte da família de vocês, muito carinho e admiração por cada um de vocês.

Aos meus amigos de São Luís, pela amizade construída, divisão de problemas, risadas, conversas, ajuda e pelos momentos bons que passamos juntos. Sinceramente grata a cada um de vocês.

Aos amigos e funcionários da Universidade Estadual de Goiás, especialmente ao Sr. Cairo, Marlene, Pedro, Isabel, Camila e Jaqueline.

A todos estagiários que puderam me ajudar neste experimento, pela importante participação e dedicação que tiveram.

Enfim, a todos que presenciaram meus estudos, agradeço de coração pelo apoio e peço desculpas pelas minhas falhas e ausência nesta fase tão importante da minha vida.

RESUMO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) se tornou uma técnica bem consolidada. Porém a busca por ferramentas vem sendo testada para melhorar os resultados. Dentre elas, a utilização do ácido ascórbico que tem se tornado bastante estudado por pesquisadores, pois sua função pode ser reduzir o estresse oxidativo, que hoje é uma realidade da PIVE. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do ácido ascórbico na PIVE, desde a maturação até a eclosão dos blastocistos. O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia em Reprodução Animal (BIOTEC) da Universidade Estadual de Goiás. Os ovários foram provenientes de abatedouro local, e transportados até o laboratório onde os mesmos foram lavados e então aspirados. Foram selecionados apenas oócitos de grau I e II para serem usados na PIVE. Os oócitos foram divididos em grupos AAMIV, AAMC e AACIV, e dentre os grupos foi utilizado ácido ascórbico em três concentrações (10 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL) mais o controle (0 µg/mL ácido ascórbico), submetidos a maturação por 24 horas com meio suplementado com ácido ascórbico no grupo AAMIV e AAMC. Na fertilização *in vitro* foram utilizados sêmen de um único touro e partida, com fertilidade conhecida, e proveniente de central. Os possíveis zigotos foram cultivados por 11 dias. No cultivo foi adicionado ácido ascórbico ao grupo AACIV e AAMC. Todas as etapas foram realizadas em estufa de cultivo celular a 38,8°C e atmosfera gasosa com 5,5% de CO₂. As análises estatísticas foram realizadas pelo ANOVA, e análise de *Bonferroni* a 5% de significância. A taxa de blastocistos em relação aos clivados (AAMIV², AAMC² e AACIV²), se diferiram ($p < 0,05$) entre si. Portanto as concentrações de 10 µg/mL e 50 µg/mL do grupo AAMIV², foram o que apresentaram os melhores resultados (65,23% e 54,50%), comparando entre os grupos com ácido ascórbico. Comparado a taxa de clivagem nas demais concentrações de ácido ascórbico dos grupos, AAMC¹ na concentração de 10 µg/mL (84,14%), de 50 µg/mL (82,68%), e de 100 µg/mL (84,16%), elas se diferem ($p < 0,05$) entre si. A taxa de eclosão de blastocisto no D11 de cultivo, não apresentou diferença estatística quando comparada entre os grupos. Por fim, ainda tem que ser feito mais estudos a respeito do antioxidante ao meio.

Palavras-chave: Antioxidante. Fecundação. PIVE. Reprodução animal. Vitamina C.

ABSTRACT

The production of embryos in vitro (PIVE) has become a well-established technique. But the search for tools has been tested to improve results. Among them, the use of ascorbic acid that has become widely studied by researchers, because its function may be to reduce oxidative stress, which today is a reality of PIVE. The objective of this work was to evaluate the effect of ascorbic acid on PIVE, from maturation to hatching of blastocysts. The experiment was carried out at the Animal Reproduction Biotechnology Laboratory (BIOTEC) of the State University of Goiás. The ovaries came from a local slaughterhouse and transported to the laboratory where they were washed and then aspirated. Only grade I and II oocytes were selected for use in PIVE. The oocytes were divided into AAMIV, AAMC and AACIV groups, and among the groups was used ascorbic acid in three concentrations (10 µg / mL, 50 µg / mL and 100 µg / mL) plus control (0 µg / mL ascorbic acid). submitted to maturation for 24 hours with medium supplemented with ascorbic acid in the AAMIV and AAMC group. *In vitro* fertilization was used semen from a single bull and broken, with known fertility, and from central. Possible zygotes were cultivated for 11 days. In cultivation, ascorbic acid was added to the AACIV and AAMC group. All steps were performed in a cell culture greenhouse at 38.8°C and 5.5% CO₂ gas atmosphere. Statistical analyzes were performed by ANOVA and Bonferroni analysis at 5% significance. The rate of blastocysts in relation to the cleaved ones (AAMIV², AAMC² and AACIV²) differed (p <0,05) from each other. Therefore, the concentrations of 10 µg / mL and 50 µg / mL of the AAMIV² group were the ones that presented the best results (65.23% and 54.50%), comparing between the groups with ascorbic acid. Comparing the cleavage rate in the other ascorbic acid concentrations of the groups, AAMC¹ at a concentration of 10 µg / mL (84.14%), 50 µg / mL (82.68%), and 100 µg / mL (84, 16%), they differ (p <0.05) from each other. The blastocyst hatching rate at D11 of culture did not show statistical difference when compared between groups. Finally, further studies on the antioxidant have yet to be done.

Key-words: Animal reproduction. Antioxidant. Fertilization. PIVE. Vitamin C.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diluição e preparação da solução mãe de ácido ascórbico, até atingir as concentrações desejadas, para uso no meio de maturação e/ou cultivo.	46
Tabela 2. Média dos resultados físico químicos, realizado pelo equipamento de análise computadorizada (CASA), de partidas de sêmen utilizados no presente estudo, logo após o descongelamento.	49
Tabela 3. Média dos resultados físico químicos, realizado pelo equipamento de análise computadorizada (CASA), de partida de sêmen utilizado no presente estudo, logo após a centrifugação com Percoll.	49
Tabela 4. Média dos resultados físico químicos, realizado pelo equipamento de análise computadorizada (CASA) de partida de sêmen utilizado no presente estudo, logo após a centrifugação com meio de capacitação.	49
Tabela 5. Efeito do ácido ascórbico na qualidade embrionária em diferentes concentrações (0 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL) no grupo maturação...51	51
Tabela 6. Avaliação da produção in vitro de embriões suplementada com ácido ascórbico no meio de maturação (AAMIV), cultivo (AACIV), e maturação/cultivo (AAMC), em diferentes concentrações (10 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL).	53
Tabela 7. Avaliação da produção in vitro de embriões suplementada com ácido ascórbico no meio de maturação (AAMIV), cultivo (AACIV), e maturação/cultivo (AAMC), em diferentes concentrações (10 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL), mais o controle.	54

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Aspiração folicular com agulha 18G (A), líquido folicular depositado dentro do tubo cônico de 50mL (B), lavagens dos oócitos com solução enriquecida (C), oócitos na placa de cultivo (D), seleção dos oócitos (E) e classificação dos oócitos (F).	45
Figura 2 Oócitos maturados após as 24h com ácido ascórbico (A), e oócitos maturados após as 24h sem ácido ascórbico (B)......	47
Figura 3. Oócitos maturados sendo lavados em duas gotas, a primeira de meio de Lavagem e a segunda de meio TALP.	48
Figura 4 Gradiente Percoll após a primeira centrifugação	48
Figura 5. Zigotos em D5 (A), Embriões em diferentes estágios em D7 (B) e embriões eclodidos em D11 (C).....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C – Graus Celsius

% - Porcentagem

μL – Microlitro

AMIV – Ácido Ascórbico no meio de maturação

AMC – Ácido Ascórbico no meio de maturação e cultivo

ACIV – Ácido ascórbico no meio de cultivo

Be – Blastocisto Eclodido

Bi – Blastocisto Inicial

Bl – Blastocisto

Bx – Blastocisto Expandido

BSA – Albumina Bovina Sérica

CAP – Meio Capacitação

CIV – Cultivo *in vitro*

CCO – Complexo *cumulus* oócitos

CO₂ – Dióxido de Carbono

DNA - Ácido Sesoxirribonucleico

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

Feed – Feeding (Alimentação, nutrição)

FIV – Fertilização *in vitro*

HEP - Heparina

IETS - Sociedade Internacional de Transferência de Embriões

LH – Hormônio Luteinizante

MIV – Maturação *in vitro*

Mo – Mórula Compacta

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mRNA – Ácido Ribonucleico Mensageiro

O₂ – Oxigênio

OPU – Ovum Pick-up

PIVE – Produção *in vitro* de Embriões

pH - Potencial Hidrogenionico

PHE – Penicilamina, Hipotaurina, Epinefrina

PBS – Tampão Salina Fosfato

SOF- Soro Fetal Bovino

TALP-FIV – Tyrode's Albumina Lactato Piruvato

TCM – Meio de Cultura para Tecidos

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	12
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS	13
2.2 ASPIRAÇÃO E SELEÇÃO DE OÓCITOS.....	14
2.3 MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> (MIV)	16
2.4 FERTILIZAÇÃO <i>IN VITRO</i> (FIV)	19
2.5 CULTIVO <i>IN VITRO</i> (CIV)	21
2.6 CLASSIFICAÇÃO DOS EMBRIÕES	24
2. 7 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs)	24
2.8 ESTRESSE OXIDATIVO.....	25
2.9 USO DE ANTIOXIDANTES NO MEIO DE PIVE	26
2.10 ÁCIDO ASCÓRBICO.....	27
REFERÊNCIAS.....	28
CAPÍTULO 2 – ARTIGO 1.....	41
RESUMO.....	41
ABSTRACT	42
1 INTRODUÇÃO	43
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
2.1 Local e Período de experimento.....	44
2.2 Obtenção e Aspiração Folicular dos oócitos	44
2.3 Separação dos grupos	45
2.3.1 Diluição e estoque do antioxidante.....	46
2.4 Maturação <i>in vitro</i>	46
2.5 Etapas da Fecundação <i>in vitro</i>	47
2.6 Cultivo <i>in vitro</i>	50
2.7 Análise estatística	52
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4. CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS.....	56
CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	59

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotécnica reprodutiva de enorme importância, que vem se estabelecendo no mundo todo, e principalmente no Brasil, pois permite o contato entre o espermatozoide e oócito fora do trato reprodutivo da fêmea, com a formação de um novo indivíduo (GONÇALVES *et al.*, 2008). No Brasil iniciou-se comercialmente em 1998, em um projeto conjunto entre a GERTEC embriões, Unesp- Jaboticabal/SP e Beabisa Agricultura (BUENO e BELTRAN, 2008; ARRUDA *et al.*, 2006).

Se tornou a principal ferramenta utilizada pelos criadores no Brasil (VIANA e CAMARGO, 2007; STROUD, 2012) por ser a biotécnica de eleição para maximizar a quantidade de descendentes dos melhores animais e acelerar o progresso genético dos rebanhos (MACHADO *et al.*, 2014). A PIVE associada à aspiração folicular guiada por ultrassom, da sigla inglesa *ovum pick-up* (OPU), viabiliza o aproveitamento de animais bastante jovens diminuindo o intervalo de gerações, produzir novilhas de reposição apenas de animais superiores e seleção de matrizes (VARAGO *et al.*, 2008; GOTTARDI *et al.*, 2012).

Envolve as etapas de coleta dos oócitos, maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo ou co-cultivo *in vitro* (CIV) de embriões fora do útero animal (VARAGO *et al.*, 2008).

A PIVE vem possibilitando vários benefícios para a reprodução animal em setores científicos, produtivos e tecnológicos (DE BEM *et al.*, 2014; MACHADO *et al.*, 2012), desenvolvidas a fim de propiciar condições mais adequadas na MIV de complexos *cumulus* (CCOs), capacitação espermática seguida de FIV, e evolução embrionário *in vitro* (VARAGO *et al.*, 2008).

Entre as dificuldades desta técnica está a necessidade de infraestrutura laboratorial, a inconsistência dos resultados referentes à taxa de mórulas e blastocistos e o tempo consumido para executar a rotina de PIVE, que vai desde a OPU a evolução *in vitro* de embriões (MIRANDA *et al.*, 2007), além do custo elevado, que com o passar dos anos está se tornando mais acessível (HANSEN *et al.*, 2008).

Nos protocolos de PIVE, a concentração de O₂ (Oxigênio) é muito alta (20%), (LUVONI *et al.*, 1996), o que aumenta significativamente a quantidade de EROs (*reactive*

oxygen species) (GOTO *et al.*, 1993; LUVONI *et al.*, 1996; SOVERNIGO *et al.*, 2017), que são altamente deletérias e causam injúrias celulares (GUÉRIN *et al.*, 2001; ANDRADE *et al.*, 2010), levando em conta que *in vivo* contém apenas de 3 a 9% de O₂, sendo então necessário a utilização de antioxidantes na PIVE, visando a redução da quantidade de EROs durante a PIVE (MATOS *et al.*, 2002; ANDRADE *et al.*, 2010). Porém, poucos estudos têm pesquisado a função do ácido ascórbico na PIVE (POZZOBON *et al.*, 2008)

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da adição de ácido ascórbico ao meio de maturação e/ou cultivo, sobre a produção e qualidade de embriões bovinos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2. 1 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

O Brasil ocupa importante posição no mercado de embriões bovinos, por sua utilização em grande escala, possuir o maior rebanho comercial do mundo, e ser o principal exportador de carne bovina (VIANA *et al.*, 2012; BOLS *et al.*, 2012), além de dominar a aspiração folicular e a PIVE (VIANA *et al.*, 2012).

O progresso da PIVE no Brasil, em questão a América do Sul foi responsável por 72,7% em bovinos (IETS, 2014). Mundialmente a transferência de embriões e aspiração folicular guiada por ultrassom teve avanço de 16,7%, comparado ao ano de 2013. O Brasil em particular, produziu 70,8% dos embriões de FIV no mundo durante o mesmo período (IETS, 2014). O Brasil ampliou mais de sete vezes a PIVE em bovinos entre 2001 (50.000 embriões) e 2013 (366.517 embriões) (KADARMIDEEN *et al.*, 2015). Os índices da PIVE retratam a competência do mercado brasileiro em programas de OPU e PIVE em larga escala (OIKAWA *et al.*, 2016).

A PIVE se apresenta como uma técnica alternativa para incrementar o uso de oócitos bovinos (NEVES *et al.*, 2010), tem o potencial de resgatar os oócitos imaturos ainda no ovário e cultivá-los *in vitro* até o estágio de blastocisto, que estarão aptos a transferir para a receptoras sincronizadas (CHAVES *et al.*, 2010).

Porém, ainda há fatores que influenciam o resultado final, como a retirada do oócito do folículo, fatores ambientais externos, falhas em alguma das etapas da PIVE

(GOTTARDI e MINGOTI, 2009). E com a grande extensão territorial além da distância entre a propriedade/laboratório de PIVE, têm limitado a produção *in vitro* comercial, decorrente das condições e o tempo gasto com o transporte dos oócitos até o laboratório e dos embriões em transportadores até a fazenda no dia em que for transferir (ALVES *et al.*, 2003; TESSMANN *et al.*, 2004).

2.2 ASPIRAÇÃO E SELEÇÃO DE OÓCITOS

A OPU tem função de obter material biológico de animais com elevado valor genético (VEGA *et al.*, 2015). É uma técnica que consiste na coleta de CCOs com o auxílio de ultrassom para guiar o procedimento de recuperação em animais vivos, através da punção folicular ovariana (PONTES, 2009; STROEBECH *et al.*, 2015; VIANA *et al.*, 2017). Foi elaborada na década de 80, o que impulsionou a PIVE no mundo, recusando assim o método cirúrgico (BOLS *et al.*, 2012).

Outra importante fonte de oócitos, é por meio de ovários coletados em abatedouros, o qual apresenta grande disponibilidade, apesar que algumas vezes se encontram um pouco afastado dos laboratórios (SANTOS *et al.*, 2017).

Os oócitos aspirados do centro dos folículos são de diâmetro de 2 a 8 mm. Os oócitos menores de 2 mm não são eficientes para recomençar a meiose e os maiores de 8 mm normalmente se deparam em processo de atresia ou maturação. Os dois tipos a viabilidade são prejudicados (GONÇALVES *et al.*, 2008).

GORDON (1994) relata a vantagem da OPU, na questão de rapidez de operação, se tornando importante em unidades ou laboratórios de PIVE. Portanto é importante levar em consideração a qualidade, há pouco mérito na rapidez dos procedimentos quando resulta em CCOs de qualidade inferior.

Os oócitos possuem seu potencial de maturação, fertilização e crescimento embrionário estimado através da aparência das CCOs, sendo classificados de acordo com a morfologia na tentativa de identificar os de maior viabilidade (GONÇALVES *et al.*, 2008)

Segundo GONÇALVES *et al.* (2008) a classificação dos oócitos é realizada com escala gradativa de qualidade de 1 a 4, sendo:

- Grau I: *Cumulus* compacto presente, contendo mais de três camadas de células. Ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração marrom;

- Grau II: *Cumulus* compacto parcialmente presente em volta do oócito ou rodeando completamente o oócito, com menos de três camadas celulares. Ooplasma com granulações distribuídas heterogeneamente, podendo estar mais concentradas no centro e mais claras na periferia ou condensadas em um só local aparentando uma mancha escura. O ooplasma preenche o espaço do interior da zona pelúcida;
- Grau III: *Cumulus* presente, mas expandido. Ooplasma contraído com espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida, preenchendo irregularmente o espaço perivitelino, degenerando, vacuolizando ou fragmentando;
- Grau IV Oócito desnudo sem *cumulus*.

Nas primeiras horas de maturação as células do *cumulus* têm papel efetivo pois (HENDRIKSEN *et al.*, 2004), resguardam o oócito do estresse oxidativo (YUAN *et al.*, 2003). As células do *cumulus* estão intimamente unidas ao oócito, durante a etapa de maturação, são secretados hormônios endógenos, determinados pelo oócito que estimulam a síntese de ácido hialurônico pelas células do *cumulus*, levando a sua expansão (GONÇALVES *et al.*, 2008).

Segundo PALMA (2008), os efeitos benéficos das CCOs sobre a fecundação é aumentar o número de espermatozoides fecundantes ao redor do oócito, através de atividade quimiotática; estabelecer um microambiente que facilita a capacitação espermática e sua penetração, por meio da secreção de fatores e modelação da tensão de oxigênio e pH; proteger o oócito de mudanças desfavoráveis, como o endurecimento prematuro da zona pelúcida (ZP) que reduzira a penetração espermática.

A eficiência de suportar os primeiros sete dias de evolução embrionária é claramente influenciada pela situação folicular a partir do qual o oócito é obtido, bem como a extensão e integridade das células do *cumulus* (SIRARD, 2017), além de oócitos de boa qualidade, com boas características morfológicas que também está relacionada (HAZELEGER e STUBBINGS, 1992; WIT e KRUIP, 2001; SIRARD, 2017).

A importância das células do *cumulus* estarem intactas para a maturação oocitária e para o desenvolvimento *in vitro* não deve ser subestimada (SIRARD, 2017).

Três passos são realizados em laboratório após a recuperação e classificação dos oócitos: maturação *in vitro*, fertilização *in vitro* e cultivo *in vitro* (THOMPSON, 2000; GARCIA *et al.*, 2004; VARAGO *et al.*, 2008).

2.3 MATURAÇÃO *IN VITRO* (MIV)

A MIV, incide na maturação oocitária, sendo a fase determinante para o sucesso da produção *in vitro*, é onde os oócitos adquirem competência para aguentar as próximas etapas do desenvolvimento embrionário (PEREIRA, 2016). Por ser ainda inferior a maturação *in vivo*, a maturação *in vitro* teve grandes avanços, tendo casos de chegar a mais de 90% de sucesso (GILCHRIST, 2004).

Durante o processo de maturação oocitária, os oócitos sofrem modificações nucleares, citoplasmáticas e moleculares, estando ligadas a mudanças estruturais e bioquímicas, fazendo com que a célula reprodutiva feminina se torne capaz de ser fecundada e concluir sua evolução embrionária (PALMA, 2008; GONÇALVES *et al.*, 2008; GOTTARD e MINGOTI, 2009; DICKINSON *et al.*, 2016). A maturação concede ao oócito expressar seu mais alto potencial de evolução após a fecundação (GEBREMEDHN *et al.*, 2016).

A maturação nuclear, é marcada pelo rompimento da vesícula germinativa, desaparecimento do nucléolo, além da condensação dos cromossomos, expulsão do primeiro corpúsculo polar e desenvolvimento do segundo fuso meiótico, com o tempo médio de 18 a 24 horas (KIM, 2008; CHAVES *et al.*, 2010).

A cinética embrionária foi estudada por SIRARD *et al.* (1989), os tempos decorridos em cada fase partindo da MIV foram as seguintes: de 10,3 a 15,4 horas em Metáfase I, de 15,4 a 16,6 horas em Anáfase I, de 16,6 a 18 horas em Telófase I, momento que ocorre a expulsão do primeiro corpúsculo polar, e de 18 a 24 horas em Metáfase II (MII) (VARAGO *et al.*, 2008; MAO *et al.*, 2014), após as 18 horas, 95% dos oócitos ou mais apresentam bloqueio em MII entre 22 a 24 horas de cultivo (BERTAGNOLLI *et al.*, 2004).

Depois de maturados, os oócitos permanecem em metáfase II até a fecundação ou a ativação partenogenética, provavelmente por ação de razões citostáticos (CSF) (BERTAGNOLLI *et al.*, 2004). Após a finalização da maturação nuclear e citoplasmática, estará apto para ser fecundado e para a evolução do crescimento embrionário (ROOVER *et al.*, 2007; AMINI *et al.*, 2016; GEBREMEDHN *et al.*, 2016).

Determinados trabalhos comprovaram que oócitos bovinos maturados por 18 horas procederam em taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário parecidos às notadas em oócitos maturados por 24 horas. O importante está em não exceder as 24 horas de MIV, uma vez que oócitos maturados por 32 horas mostraram abundante queda no desenvolvimento embrionário após a FIV, provando o efeito prejudicial do envelhecimento oocitário sobre as taxas de produção embrionária (GORDON, 1994; WEHREND e MEINECKE, 2001).

As alterações citoplasmáticas são ações complexas, nas quais diversos acontecimentos simultâneos sucedem, possuindo alterações na morfologia e no remanejamento de organelas e liberação de cálcio (HAFEZ e HAFEZ, 2004; ANGUITA *et al.*, 2007).

Enquanto a maturação molecular consiste no processo de transcrição e processamento de mRNAs que serão traduzidos em proteínas pelos ribossomos, proteínas as quais estão envolvidas no mecanismo de maturação e nas etapas celulares seguintes, tais como fecundação, formação dos pronúcleos e início da embriogênese (GONÇALVES *et al.*, 2007; CHAVES *et al.*, 2010).

A maturação incompleta, impede a fecundação e aumenta caso de polispermia, de partenogênese e bloqueia o crescimento embrionário (MINGOTI, 2005; VARAGO *et al.*, 2008; GASPARRINI *et al.*, 2008; NEGLIA *et al.*, 2011), foi observado que pode ser decorrente de falha na maturação nuclear e/ou citoplasmática (ANCIOTO *et al.*, 2004, GONÇALVES *et al.*, 2007).

Segundo PALMA (2001), dentre os motivos que acometem a MIV dos oócitos em desenvolvimento embrionário está a origem dos oócitos. Se estes provem de folículos grandes ou pequenos, estado cíclico da fêmea, estado nutricional, saúde e integridade do folículo, atresia, dominância, estado sexual, comunicação entre o oócito e as células do *cumulus*, estimulação folicular e condições de cultivo *in vitro*.

Existem vários meios de maturação para a PIVE. Vários meios e protocolos estão sendo estudados e testados na MIV dos oócitos, como o Synthetic Oviductal Fluid – SOF, Ham's F-12 e o Tissue Culture Medium 199 (TCM199®). Dessa forma, o TCM199® é o mais usual entre a maioria dos laboratórios de PIVE (GORDON, 1994; PALMA, 2001; GOTTARDI e MINGOTI, 2009). Este meio é modificado de acordo com cada laboratório, sendo geralmente adicionado soro fetal bovino (SFB), aminoácidos como a L-glutamina, bicarbonato de sódio, vitaminas, lactato, piruvato de sódio,

antibióticos, entre outras substâncias próximo as concentrações encontradas no soro sanguíneo (GORDON, 1994; GANDHI *et al.*, 2000; SMETANINA *et al.*, 2000; MINGOTI, 2005; GONÇALVES *et al.*, 2007; PALMA, 2008;).

A suplementação com o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH) é de extrema importância, sendo a suplementação de estradiol-17 β nos meios MIV opcional (VARAGO *et al.*, 2008). Os hormônios LH e FSH proporcionam melhor expansão nas células do *cumulus*, pois o FSH estimula a elaboração de estruturas sinalizadoras pelas células somáticas que atraem a volta da meiose e facilitam a fertilização (GOTTARDI e MINGOTI, 2009).

Os princípios proteicos de proveniência animal como o SFB ou BSA (MINGOTI *et al.*, 2002), tem apresentado os melhores resultados na maturação oocitária e no desenvolvimento dos embriões (CAROLAN *et al.*, 1995; RODRIGUES *et al.*, 2010). Todavia, meios contendo SFB ou BSA não apresentam formulação definida e possuem componentes como fatores de crescimento, aminoácidos e proteínas que variam significativamente entre diferentes partidas e fornecedores (MCKIERNAN *et al.*, 1992; GARDNER, 1994; THOMPSON *et al.*, 1995; VARAGO *et al.*, 2008).

Entretanto, a substituição do SFB na PIVE ainda é um amplo desafio, aceito que de modo comum, os meios suplementados com esta fonte proteica ainda são os que proporcionam os melhores percentuais de produção embrionária (DUQUE *et al.*, 2003).

Nos meios de cultura várias proteínas são adicionadas e desempenham papel importante, para a redução da embriotoxicidade do suplemento ou de produtos do metabolismo embrionário, fonte básica de necessidades nutritivas do embrião, fonte de fator de crescimento, promoção do desenvolvimento direta ou indiretamente do embrião através da proliferação das CCOs (ECKERT e NIEMANN, 1995).

Para se obter sucesso na produção *in vitro* é necessário a utilização de tampões no meio para reduzir as variações do potencial hidrogenionico (pH), que deve permanecer entre 7,3 e 7,5 (GOTTARDI e MINGOTI, 2009; MORAES, 2018), além da osmolaridade e a composição iônica adequada (GONÇALVES *et al.*, 2002). Portanto fora o meio, é necessário o uso de uma estufa que conserve a atmosfera gasosa e temperatura controlada e adequada, e até mesmo a manipulação (CAIADO CASTRO *et al.*, 2003; GARCIA *et al.*, 2004; GONÇALVES *et al.*, 2007; VARAGO *et al.*, 2008).

Tem se tornado objeto de estudo de diversas pesquisas a necessidade de desenvolver meios de maturação associados à suplementação com diferentes

substâncias, como fatores de crescimento e antioxidantes (NANDI *et al.*, 2002; SINGHAL *et al.*, 2009; ROCHA-FRIGONI *et al.*, 2016).

2.4 FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* (FIV)

PALMA (2001) descreve a FIV como sendo o procedimento do qual os oócitos maduros são cultivados junto com os espermatozoides e fecundados, gerando posteriormente o zigoto, que evolui até o estágio de blastocisto (MACHATY *et al.*, 2012; MELO *et al.*, 2016).

Para o êxito da FIV esta requer o preparo adequado de ambos gametas, masculino e feminino, assim como meios de cultivo e condições favoráveis para que ocorra a fertilização (GORDON, 1994). Fatores que podem afetar a taxa de fecundação, tais como a dose de sêmen, a diferença entre touros na capacidade de fecundar e produzir embriões, variação individual de touros, estes sendo fatores que podem interferir na FIV e produção de embriões (WATANABE *et al.*, 1999; NEDAMBALE *et al.*, 2006).

Foi evidenciado que a presença de parâmetros espermáticos anormais, muitas vezes decorrentes do estresse oxidativo, resultam em falha ou atraso na fecundação e/ou desenvolvimento embrionário anormal (BARROSO *et al.*, 2006). O espermatozoide mesmo quando danificado pode ser capaz de fertilizar um oócito, mas a qualidade do embrião pode ser comprometida (FERNANDÉZ-GONZALEZ *et al.*, 2008).

Os espermatozoides dos mamíferos após serem ejaculados não possuem eficiência para fecundação, mesmo encontrando-se móveis e apresentando morfologia aparentemente normal. *In vivo*, a capacidade fecundante é completada quando o espermatozoide atinge o trato genital da fêmea (BALL e PETERS, 2004). *In vitro* o potencial do espermatozoide em adquirir a competência para fecundar o oócito precisa sofrer modificações bioquímicas atingindo a capacitação (BALL e PETERS, 2004; PONTES, 2009; FLAHERTY, 2015).

A capacitação irá provocar a desestabilização da membrana plasmática dos espermatozoides pela remoção de algumas proteínas, sem modificações morfológicas, porém bioquímicas, resultando na hiperativação espermática (GONÇALVES *et al.*, 2008). Hiperativação ou motilidade hiperativada é definida como

o padrão de movimento flagelar apresentado pelo espermatozoide no sítio de fertilização (GABALDI *et al.*, 2002; BALL e PETERS, 2004).

É comum vários laboratórios utilizarem sêmen congelado. Para que a capacitação ocorra, após o descongelamento é preciso selecionar e recuperar os espermatozoides móveis e aptos a fecundar (VARAGO *et al.*, 2008). Em outras palavras, separar os espermatozoides vivos dos mortos, do plasma seminal ou do diluente usado para o congelamento, tendo-se um meio livre de contaminantes (HENKEL e SCHILL, 2003; GONÇALVES *et al.*, 2007; FONSECA, 2010).

O procedimento ideal para separação espermática deve ser rápido, simples, de baixo custo, capaz de garantir a maior parte dos espermatozoides móveis, não sofrer alterações espermáticas, remover substâncias tóxicas e bioativas, além de espermatozoides mortos entre outras células, incluindo microrganismos, permitindo processar grandes volumes de sêmen, além de possibilitar o controle da concentração e volume final da suspensão espermática (MARTINEZ, 2007).

O gradiente de Percoll® proporciona maior recuperação de espermatozoides móveis quando comparado com o *swim up*, devido ao número superior de espermatozoides recuperados e maior motilidade espermática (PARRISH, 1995). É constituído por partículas de sílica coloidal coberto com polivinilpirrolidona, preparado em diferentes concentrações para formar o gradiente necessário de separação espermática (GONÇALVES *et al.*, 2002; GORDON, 2003).

O processo de separação espermática com o Percoll® é caracterizado pela centrifugação através de um gradiente de concentração, como uma mistura de Percoll® 45% sobre uma solução de 90%, para permitir a separação dos espermatozoides vivos dos demais constituintes do sêmen, baseado na diferença de densidade (WRENZYCKI, 2001; SILVA *et al.*, 2011).

Talvez mais importante que a seleção dos espermatozoides seja a capacitação destas células porque somente o espermatozoide capacitado tem habilidade de ligar-se à ZP do oócito pois somente ele consegue sofrer reação acrossômica (RA) (CORRÊA, 2006).

O meio FERT-TALP (Tyrode-albumina-lactato-piruvato) tem sido o mais empregado em protocolos de fertilização de embriões bovinos. Contém em sua composição fatores apropriados para levar a capacitação espermática, como é o caso da heparina (IRITANI e NIWA, 1977; VARAGO *et al.*, 2017) que foi um marco histórico para PIVE (MOURA, 2016; MELO *et al.*, 2016).

Além da heparina ser considerada importante capacitador de espermatozoides (PARRISH, 1995), aumentar a atividade espermática e facilitar a penetração, é comumente utilizada pelos laboratórios a adição de aminoácidos ao meio, como a penicilina, hipotaurina e epinefrina (PHE), melhorando os índices de capacitação do acrossoma do espermatozoide (PALMA, 2001; GONÇALVES *et al.*, 2002; KASSESNS *et al.*, 2015; MENCHACA *et al.*, 2016). A hipotaurina com adrenalina são capazes de estabelecer a elaboração de superóxido que pode parar a peroxidação lipídica na célula espermática (GORDON, 2003).

Após à seleção dos espermatozoides, são feitas as análises para definir a concentração espermática, que é avaliada com o objetivo de aferir a quantidade de espermatozoides vivos presentes em cada palheta e também é feito o teste de motilidade do espermatozoide, devendo sempre ser progressiva (GONÇALVES *et al.*, 2008).

Segundo DIAS *et al.* (2006), a fecundação é realizada com os resultados a receber através do cálculo com fundamento na motilidade e na concentração espermática. A quantidade definida de espermatozoides é depositada em contato com os oócitos presentes em cada gota do meio FIV, que são cobertos com óleo mineral e logo em seguida colocados em estufa de CO₂, nas mesmas condições da maturação, apenas o período de incubação que varia entre 12 a 20 horas (BUENO e BELTRAN, 2008), de acordo com os protocolos utilizados pelos laboratórios (GARCIA *et al.*, 2004; MINGOTI, 2005).

2.5 CULTIVO *IN VITRO* (CIV)

O cultivo *in vitro* é período de evolução do oócito fertilizado até o estágio de blastocisto. Enquanto tal período sucede a ativação do genoma embrionário, modo de divisão celular, compactação dos blastômeros no estágio de mórula e início da distinção embrionária com a formação do blastocelo (GARCIA, *et al.*, 2004; BUENO e BELTRAN, 2008; LIMA e SOUZA, 2009; BARRONDO, 2013), na qual, assim, podem ser transferidos para o útero de receptoras (DODE e RUMPF, 2002).

LIMA e SOUZA (2009) afirmam que o zigoto, estágio embrionário inicial, difere do blastocisto, estágio embrionário final, em termos de morfologia e características fisiológicas e bioquímicas. As principais alterações morfológicas que ocorrem no

embrião inicialmente é a compactação dos blastômeros (mórula compacta) e o desenvolvimento da blastocle (blastocisto inicial).

A compactação dos blastômeros se determina por um aumento do contato celular entre blastômeros, o qual permanece até o total desaparecimento dos limites celulares individuais por meio de junções de adesão. O estágio de blastocisto é definido pela diferenciação de células do trofotoderma, que se localizam mais externamente e circundam a blastocle, e pela formação da massa celular interna (WATSON e BARCROFT, 2000).

Para se conseguir taxas satisfatórias de crescimento embrionário, é fundamental manter as condições mais próximas possíveis encontradas na tuba uterina (LIMA e SOUSA, 2009), o pH, oxigênio, hormônios e nutrientes devem estar presentes nas mesmas quantidades ou em quantidades próximas às do ambiente uterino (WRENZYCKI, 2001; FIGUEIREDO, 2010).

Os embriões são capazes de se desenvolver em diferentes meios de cultivo, desde simples soluções de sais balanceadas até sistemas complexos. O Tissue Culture Medium 199 é um meio de cultivo complexo desenvolvido para a preservação celular em geral, enquanto que o SOF é classificado como um meio simples, desenvolvido e direcionado para a criação de embriões (GONÇALVES *et al.*, 2008).

WRENZYCKI *et al.* (2001) utilizaram os dois meios para cultivo embrionário em bovinos e não encontraram diferenças nas taxas de clivagem, mórulas e blastocistos, porém sugeriram que o uso do SOF proporciona um ambiente mais adequado, pois existem diferenças no padrão de expressão de genes ligados à pré-implantação de embriões.

Os componentes que fazem parte do meio de cultivo interferem na produção e qualidade embrionária, substâncias como lactato e piruvato são essenciais durante a fase de divisão e desenvolvimento inicial do embrião. A glicose, na presença de fosfato, atrasa ou para a evolução embrionária inicial, porém esse carboidrato é fundamental na fase de compactação e de blastocisto (PEREIRA, 2016).

Estudos têm demonstrado, que o meio SOF pode ser utilizado com alta tensão de oxigênio, desde que as CCOs remanescentes no zigoto após a FIV sejam mantidas (MATTOS *et al.*, 2002). Afim de melhorar as condições e os meios de cultivo dos embriões e sua composição, fatores de crescimento como o uso de soro fetal bovino, BSA são determinantes para o cultivo embrionário (WRENZYCKI, 2001; FIGUEIREDO, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2010).

Uma das funções do SFB e do BSA que são fontes proteicas mais utilizadas, é a amparo do embrião no CIV contra a instauração de radicais livres (BAVISTER, 1995), além de proporcionar ainda maiores contribuições de desenvolvimento de embriões (LONERGAN *et al.*, 1999; LEIVAS *et al.*, 2011).

Outro fator proeminente, e pertinente a compor os meios de cultivo, é o estresse oxidativo proveniente de alta tensão de oxigênio (20%), que causa retardo no desenvolvimento dos embriões em sistema de cultivo convencionais, devido à produção de peróxido de hidrogênio, que lesiona o DNA da célula, como relataram (BASINI *et al.*, 2008; ANDRADE *et al.*, 2010; TAKAHASHI *et al.*, 2016) porém vem sendo estudado múltiplas substâncias antioxidantes que têm sido avaliadas para compor os meios, assim como a quercetina, cisteamina (GUEMRA *et al.*, 2013) e a N,N-dimetilglicina (DMG) (TAKAHASHI *et al.*, 2016). Além de reduzir o tempo de manuseio sob a luz incandescente, redução da tensão de O₂ (ANDRADE *et al.*, 2010; SILVA e JASIULIONIS, 2014; MORAES, 2018). Oxidantes induzem a apoptose e a adição de antioxidante como o ácido ascórbico, inibem esta resposta (KIM *et al.*, 2004; CROCOMO *et al.*, 2012).

Posteriormente a MIV, aproximadamente 90% dos oócitos submetidos à maturação cheguem a metáfase II com expulsão do primeiro corpúsculo polar. Destes, 80% são fecundados e começam a se repartir, pelo menos até o estágio de duas a quatro células. Portanto, apenas 25 a 40% destes embriões obtêm o estágio de blastocisto ou blastocisto expandido (BAVISTER *et al.*, 1992; LONERGAN *et al.*, 2002). Este acontecimento comprova que o CIV é o principal passo a decidir a eficácia do sistema e que muito deve ser feito para o progresso dos resultados (GALLI *et al.*, 2003).

Por um período de sete dias os embriões são mantidos no CIV, a qualidade do mesmo está ligada diretamente à qualidade do meio de cultivo utilizado, e as condições de realização do cultivo (LONERGAN *et al.*, 2002). Para estimativa da taxa de eclosão ou da condição embrionária, especialmente pela determinação do número e viabilidade de blastômeros, o CIV pode se estender até o 8º ou 9º dia após a FIV (GONÇALVES *et al.*, 2002; MINGOTI, 2005).

2.6 CLASSIFICAÇÃO DOS EMBRIÕES

No processo de classificação leva-se em consideração o aspecto morfológico do embrião e as variações que ocorrem no mesmo durante seu desenvolvimento inicial. Segundo MARTINEZ e SOUZA (2007) os principais parâmetros considerados para avaliação da qualidade são formato, simetria, coloração, extrusão celular e integridade da ZP. O embrião excelente tem que apresentar ZP íntegra, simétrico com células, coloração e textura uniformes; o bom, apresentar pequenas imperfeições como poucos blastômeros e células que se soltaram da massa embrionária, formato irregular, alteração de cor ou presença de poucas vesículas; o regular, maior número de imperfeições, com alguns blastômeros extrusos, e algumas células degeneradas; o pobre apresenta severas alterações como numerosos blastômeros extrusos, degenerados e de tamanhos variados.

De acordo com HAFEZ e HAFEZ. (2004) a classificação é realizada da seguinte maneira: Mo – Mórula: Blastômeros individuais não- distintos, espaço perivitelino ocupado pelo embrião; Mc – Mórula Compacta: Blastômeros individuais tornam-se mais próximos, formando uma massa embrionária compacta que ocupa dois terços do espaço perivitelino; Bi – Blastocisto Inicial: Embrião com a cavidade preenchida com fluido ou blastocelo, ocupando três quartos de espaço perivitelinico, trofoblasto e MCI podem ser diferenciadas; BI – Blastocisto: Pronunciada diferenciação do trofoblasto externo, MCI compacta e mais escura, blastocisto muito proeminente e embrião ocupando quase todo o espaço perivitelinico; Bx – Blastocisto expandido: o embrião cresce notadamente em tamanho, a zona pelúcida torna-se mais fina; Bn – Blastocisto em Eclosão: o embrião no processo de eclosão, zona pelúcida despreendida; Be – Blastocisto Eclodido: o embrião expandido com blastocisto grande, circular, muito frágil e em estágios mais avançados, alongados.

2. 7 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs)

As EROs incluem todos os radicais e não radicais derivados do oxigênio, os quais são eletronicamente instáveis e, por isso, altamente reativos, tendo a capacidade de reagir com grande número de compostos que estejam próximos. Eles podem exercer a função de agentes oxidantes, atuando como receptores de elétrons, ou de agentes redutores, como doadores de elétrons (AGARWAL *et al.*, 2005).

A mitocôndria é o principal local de produção de espécie reativa de oxigênio (BARJA, 2007) e durante o transporte de elétrons na mitocôndria, o oxigênio, pode ser reduzido parcialmente, podendo gerar espécies reativas de oxigênio. Segundo GUEMRA (2013) os três principais tipos de EROs na PIVE bovina são: superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroxila ($OH^{\cdot}$). Superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Se o O_2 for em partes reduzido pela recepção de somente um elétron o produto desta redução será o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Este radical ao receber mais um elétron e dois íons de hidrogênio, formará o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Da reação entre o peróxido de hidrogênio e íons de ferro ou cobre ocorrerá a formação da radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), tornando mais reativo. O $OH^{\cdot}$ pode ser formado também pela reação entre o H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$. Estes são alguns exemplos das espécies reativas do oxigênio que podem ser formados (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; AL GUBORY *et al.*, 2010; MARTELLI e NUNES, 2014; SILVA e JASIULIONIS, 2014).

2.8 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo tem como definição o desequilíbrio entre a produção de EROs e os agentes antioxidantes (AGARWAL *et al.*, 2005; HENDRICKS e HANSEN, 2010; GUPTA *et al.*, 2010). O estresse oxidativo influencia negativamente a eficiência da produção *in vitro* de embriões (TRINDADE *et al.*, 2016) principalmente nos processos de maturação e cultivo dos prováveis embriões (ANDRADE *et al.*, 2010).

O quadro de estresse oxidativo ocorre quando a produção de EROs é superior a eficiência dos mecanismos endógenos protetores (FEUGANG *et al.*, 2009) podendo alterar de modo importante o desempenho celular (SILVA *et al.*, 2011) e embrionário (GUÉRIN *et al.*, 2001). Nos gametas e embriões pode acontecer peroxidação dos lipídios das membranas (LIMA e ABDALLA, 2001) avarias ao DNA e esgotamento celular por apoptose ou necrose (SILVA *et al.*, 2011). Para reverter, o quadro de estresse oxidativo é preciso reduzir a produção de EROs ou aumentar a quantidade de antioxidantes disponíveis (ANDRADE *et al.*, 2016).

In vivo, os oócitos e embriões estão protegidos contra o estresse oxidativo pela presença de antioxidantes no fluido folicular e oviduto (CROCOMO *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2002) e os embriões produzidos *in vitro* são mais susceptíveis aos efeitos do estresse oxidativo, pois, seus mecanismos de defesa não são suficientes

para proteger sua delicada estrutura celular (AITKEN *et al.*, 1993). Como consequência podem ser constatados, bloqueio da meiose oocitária e do desenvolvimento embrionário (CROCOMO *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2002).

2.9 USO DE ANTIOXIDANTES NO MEIO DE PIVE

Na MIV e CIV a adição de antioxidantes promove efeitos benéficos (TIAN *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2014). Supõe-se que o meio FIV não necessite conter antioxidante uma vez que, os EROs são essenciais para hiperativação, capacitação e reação acromossômica dos espermatozoides (CROCOMO, *et al.*, 2012).

Para proteger os oócitos e embriões de estresse oxidativo durante o CIV, vários antioxidantes podem ser adicionados ao meio de cultura (ALI *et al.*, 2003). Antioxidante pode ser definido como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas àquela do substrato oxidável, retarda ou previne, significativamente, a oxidação daquele substrato. Em condições normais, os antioxidantes convertem EROs em água para prevenir a superprodução destes compostos (SILVA e JASIULIONIS, 2014).

Como amparo as decorrências prejudiciais do excesso de metabólitos de oxigênio, o organismo dispõe de dois sistemas antioxidantes os não enzimáticos e enzimáticos. Estes agem em distintos níveis de proteção dificultando a formação e ação oxidativa das EROs e reparando as lesões provocadas pelos metabólitos oxidativos (CROCOMO *et al.*, 2012).

Antioxidantes não enzimáticos, sintéticos ou suprimentos da dieta, abrange compostos de baixo peso molecular presentes na dieta assim como ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), selênio, zinco, taurinas, hipotaurinas, ncaroteno e ácido lipoico (BARBOSA *et al.*, 2010; NIKSERESHT *et al.*, 2017; SOVERNIGO *et al.*, 2017). Do mesmo modo são contidos os compostos tióis como: cistina, cisteína, cisteamina e beta-mercaptoetanol, (GUÉRIN *et al.*, 2001; PRASAD *et al.*, 2010; CROCOMO *et al.*, 2012; NIKSERESHT *et al.*, 2017; SOVERNIGO *et al.*, 2017).

2.10 ÁCIDO ASCÓRBICO

Conhecido como ácido ascórbico, ascorbato, vitamina C, entre outros, é um antioxidante não enzimático e hidrossolúvel (HALLIWELL, 1989; OLSON e SEIDEL JR, 2000) tendo como principais funções a secreção hormonal, síntese de colágeno e antioxição (THOMAS *et al.*, 2001; MONTEIRO *et al.*, 2005). Sua importância cresceu ao longo do tempo devido seu potencial antioxidante do fluido extracelular (ALVAREZ *et al.*, 2006; HOSSEIN *et al.*, 2007) capaz de neutralizar e proteger os tecidos contra a ação das espécies reativas de oxigênio (FREI *et al.*, 1989; HALLIWELL, 1989; BUETTNER, 1992) os quais podem provocar danos ao DNA, proteínas, carboidratos, lipídeos e membranas biológicas (LUCK *et al.*, 1995).

A adição do ácido ascórbico ao meio de cultivo reduz a apoptose folicular em ratos, camundongos e bovinos (WANG *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2004) podendo atuar fisiologicamente como antioxidante na maturação de oócitos e no desenvolvimento de embriões (PASZKOWSKI e CLARKE, 1999).

REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.3, n.28, p.1-21, 2005.

AL-GUBORY, K. H.; FOWLER, P. A.; GARREL, C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.42, n.10, p.1634–1650, 2010.

ALI, A. A.; BILODEAU, J. F.; SIRARD, M. A. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. **Theriogenology**, v. 59, n. 3-4, p. 939-949, 2003.

ALVAREZ, C. A.; MORAES, G. V.; SCAPINELLO, C.; MARTINS, E. N.; CARDOZO, R. M.; MARCELA MATAVELI, M.; KIOSHIMA, R. S. Efeito da suplementação de selenometionina e vitamina C sobre a morfopatologia espermática do sêmen de coelho. **Acta Scientiae Animal**, v.28, p.165-175, 2006.

ALVES, D. F.; RAUBER, L. P.; RUBIN, F. B.; BERNARDI, M. L.; DEZEN, D.; SILVA, C. A. M.; RUBIN, M. I. B. Desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular ou TCM-hepes [Embryo development *in vitro* of bovine oocytes maintained in follicular fluid or TCM-Hepes], **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, p.279-286, 2003.

* Comunicação pessoal de Aécio Martins Junior, em 20 de setembro de 2018, recebida por correio eletrônico.

AMINI, E. D. V. M.; ASADPOURP, R.; ROSHANGARP, L.; JAFARI-JOOZANIP, R. Effect of linoleic acid supplementation on *in vitro* maturation, embryo development and apoptotic related gene expression in ovine. **Reprod Bio Med**, v.14, p. 255-262, 2016.

ANCIOTO, K. L.; VANTINI, R.; GARCIA, J. 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 Animal**, v.32, supl, 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, n.2, p.79-85, 2010.

ANGUITA, B.; JIMENEZ-MACEDO, A. R.; IZQUIERDO, D.; MOGAS, T.; PARAMIO, M. T. Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, p34 (cdc2) expression and MPF activity in prepuberal goat oocytes. **Theriogenology**, v.67, n.3, p.526-536, 2007.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ANDRADE, A. F.C.; RAPHAEL, C. F.; PERES, K. R.; NEVES, L. C. **Influência da qualidade do sêmen nos resultados de prenhez**

em programas de IATF E TETF. In: 2º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2, Londrina, PR. Londrina: [s.n], p.157-164, 2006.

AVELINO, K.B. **Efeitos de fontes energéticas, antioxidantes e atmosfera gasosa, em meio quimicamente semi-definido no desenvolvimento de embriões bovinos de duas células até blastocisto expandido.** 70p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) Jaboticabal: FCAV-UNESP, 2000.

BALL, P. J. H.; PETERS, A. R. Fertilization, Conception and Pregnancy, In: **Reproduction in Cattle.** Oxford-UK: Blackwell Publishing, 3º ed, 2004.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v.23, n.4, p.629-643, 2010.

BARJA, G. Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated: Implications for aging studies. **Rejuvenation Research**, v.10, n.2, p.215-223, 2007.

BARRONDO, M. del. C. **Influência de diferentes suplementos na maturação oocitária sobre o acúmulo de lipídeos citoplasmáticos em oócitos e embriões bovinos cultivados in vitro.** Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Agrária. UNESP, 2013

BARROSO, G.; TAYLOR, S.; MORSHEDI, M.; MANZUR, F.; GAVIÑO, F.; OEHNINGER, S. Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm subpopulation. **Fertility and Sterility**, v.85, n.1, p.149-154, 2006.

BASINI, G.; SIMONA, B.; SANTINI, S. E.; GRASSELLI, F. Reactive oxygen species and anti-oxidant defences in swine follicular fluids. **Reproduction, Fertility and Development**, v.20, n.2, p.268-274, 2008.

BAVISTER, B. D. Culture of preimplantation embryos: facts and artefacts. **Human Reproduction Update**, v.1, n.2, p.91-148, 1995.

BAVISTER, B. D.; ROSE-HELLEKANT, T. A.; PINYOPUMMINTR, T. Development of *in vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. **Theriogenology**, v.37, n.1, p.127-146, 1992.

BERTAGNOLLI, A. C.; GONÇALVES, P. B. D.; GIOMETTI, I. C.; COSTA, L. F. S.; OLIVEIRA, J. F. C.; GONÇALVES, I. D. V.; BARRETO, K. P.; EMANUELLI, I. P.; BORGE, L. F. K. 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**, v. 56, n.4, p.488-496, 2004.

BOLS, P. E. J.; JORSSSEN, E. P. A.; GOOVAERTS, I. G. F.; LANGBEEN, A.; LEROY, J. L. M. R. High throughput non-invasive oocyte quality assessment: the search continues. **Animal Reproduction**, v.9, n.3, p.420-425, 2012.

BUENO, A. P.; BELTRAN, M. P. Produção *in vitro* de embriões bovinos. Revista científica eletrônica de medicina veterinária – ISSN: 1679-7353. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, ano 6, n.11, Jul/2008.

BUETTNER, G. R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocoferol, and ascorbate. **Arch. Biochem. Biophys**, v.300, p.535-543, 1992.

CAIADO CASTRO, V. S. D; SÁ BARRETTO, L. S; GARCIA, J. M; MINGOTI, G. Z. Influência do suplemento de macromoléculas e da atmosfera gasosa na maturação de oócitos bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, p.272-273, 2003.

CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; VAN-LANGENDONCKT, A.; MERMILLOD, P. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization *in vitro*. **Theriogenology**, v.43, n.6, p.1115- 1128, 1995.

CHAVES, R. N.; DUARTE, A. B. G.; MATOS, M. H. T.; FIGUEIREDO, J.R. Sistemas de cultivo *in vitro* para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, p. 37-49, 2010.

CORRÊA, G. A. **Tensão de oxigênio durante o cultivo *in vitro* de embriões bovinos: efeito na produção e expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo**. 2006. 76f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade de Brasília, Brasília – DF.

CROCOMO, L. F.; MARQUES FILHO, W. C.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; BICUDO, S. D. Produção de embriões *in vitro*: Estresse oxidativo e antioxidantes. **Veterinária e Zootecnia**, v.19, n.4, p.470–479, 2012.

DE BEM, T. H. C.; ADONA, P. R.; BRESSAN, F. F.; MESQUITA, L. G.; CHIARATTI, M. R.; MEIRELLES, F. V.; LEAL, C. L. V. The influence of morphology, follicle size and Bcl-2 and Bax transcripts on the developmental competence of bovine oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, p.576-583, 2014.

DIAS, L. P. B.; SA, W. F.; CAMARGO, L. S. A.; RAMOS, A. A.; FERREIRA, A. M.; VIANA, J. H. M.; NOGUEIRA, L. A. G. Concentração espermática e tempo de incubação na fecundação *in vitro* usando-se sêmen de touros da raça Guzerá. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**, v.58, 2006.

DICKINSON, S. E.; GEARY, T. W.; MONNIG, J. M.; POHLER, K. G.; GREEN, J. A.; SMITH, M. F. Efeito da maturação do folículo pré-ovulatório no estabelecimento da prenhez em bovinos: o papel da competência oocitária e do ambiente materno, **Anais**. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu, v.30, p.107-114, 2016.

DUQUE, P.; HIDALGO, C. O.; GOMEZ, E.; PINTADO, B.; FACAL, N.; DIEZ, C. Macromolecular source as dependent on osmotic pressure and water source: effects on bovine *in vitro* embryo development and quality. **Reproduction Nutrition Development**, v.43, p.487-496, 2003.

ECKERT, J.; NIEMANN, H. *In vitro* maturation, fertilization and culture to blastocysts o bovine oocytes in protein-free media. **Theriogenology**, n. 43, p. 1211-1225, 1995.

EROY, J. L. M. R. High throughput non-invasive oocyte quality assessment: the search continues. **Animal Reproduction**, v.9, n.3, p.420-425, 2012.

FERNANDÉZ-GONZALEZ, R.; MOREIRA, P. N.; PÉREZ-CRESPO, M.; SÁNCHEZ-MARTÍN, M.; RAMÍREZ, M. A.; PERICUESTA, E.; BILBAO, A.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; HOURCADE, J. D.; FONSECA, F. R.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. **Biology of Reproduction**, v.78, n.4, p.761–772, 2008.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista de Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FERRO, A. C.; DA SILVA, C.; CALEGARI, R. S.; CRESPILO, A. M.; JUNIOR MARTINS, A. Produção de embriões *in vitro* em meio de cultura com ácido ascórbico. **Veterinária e Zootecnia**, v.16, n.1, p. 80-88, 2009.

FEUGANG, J. M.; CAMARGO-RODRIGUEZ, O.; MEMILI, E. Culture systems for bovine embryos. **Livestock Science**, v.121 (2-3), p.141-149, 2009.

FIGUEIREDO, J. R.; CELESTINO, J. J. H.; FAUSTINO, L. R.; RODRIGUES, A. P. R.; Avanços no ovário artificial em caprinos. **Anais**. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Porto de Galinhas, v.24, p.133-139, 2010.

FLAHERTY, C. O. Redox regulation of mammalian sperm capacitation. **Asian Journal of Andrology Veterinary**, v17, p.583-590, 2015.

FREI, B.; ENGLAND, L.; AMES, B. N. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. **Med. Science**, v86, p.6377-6381, 1989.

FUJITANI, Y.; KASAI, K.; OHTANI, S.; NISHIMURA, K.; YAMADA, M.; UTSUMI, K. Effect of oxygen concentration and free radicals on *in vitro* development of *in vitro*-produced bovine embryos. **Journal of Animal Science**, v.75, n. 2, p. 483-489, 1997.

GABALDI, S. H.; WOLF, A.; ESPER, C. R. Os eventos da fertilização em mamíferos. **Ciência, Agricultura e Saúde**, v. 2, p 61-65, n. 2, 2002.

GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v.59, n.2, p.599-616, 2003.

GALLI, C.; LAZZARI, G. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.42 (1-4), p.371-379, 1996.

GANDHI, A. P.; LANE, M.; GARDNER, D. K.; KRISHER, R. L. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. **Human Reproduction**, v.15, n.2, p.395-401, 2000.

GARCIA, L; AVELINO, K; VANTINI, R. Estado da arte da fertilização *in vitro* em bovinos. **Annals of the First International Symposium on Animal Reproduction Applied**, 14 – 16 October, p. 223-230, 2004.

GARDNER, D. K. Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. **Cell Biology International**, v.18, n.12, p.1163-1180, 1994.

GASPARRINI, B.; DE ROSA, A.; ATTANASIO, L.; BOCCIA, L.; DI PALO, R.; CAMPANILE, G.; ZICARELLI, L. Influence of the duration of in vitro maturation and gamete co-incubation on the efficiency of in vitro embryo development in Italian Mediterranean buffalo (*Bubalus bubalis*). **Animal Reproduction Science**, v.105, n.3, p.354-364, 2008.

GEBREMEDHIN, D.; PANDEY, H. O.; SALILEW-WONDIM, D.; HOELKER, M.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Dinâmica e papel dos microRNAs durante o desenvolvimento folicular em mamíferos. **Anais...** Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu, 2016, v. 30, p. 140-147. 2016.

GILCHRIST, R. B.; RITTER, L. J.; ARMSTRONG, D. T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim. Reprod. Sci.* v. 82-83, p. 431-446, 2004.

GONÇALVES, P. B. D.; BARRETA, M. H.; SANDRI, L. R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A. Q. Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.212-217, 2007.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2ª ed. São Paulo – SP: Varela, p.408, 2008.

GORDON I. Oocyte recovery and maturation. In: Gordon I. Laboratory production of cattle embryos, 2nd Edition, Wallingford, UK: CAB International, p.30-65, 1994.

GOTO, Y.; NODA, Y.; MORI, T.; NAKANO, M. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured *in vitro*. **Free Radical Biology and Medicine**, v.15, n.1, p.69-75, 1993.

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.

GOTTARDI, P. F.; BARRETO, L. S. S.; GONÇALVES, F. S.; PERRI, S. H. V.; MINGOTI, G. Z. Efeito das células do cumulus e cisteamina durante o cultivo de maturação in vitro de oócitos bovinos sobre a maturação nuclear e aquisição da competência para desenvolvimento embrionário. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.2, p.245-252, 2012.

GUEMRA, S. Maturação *in vitro* de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.6, p.1616-1624, 2013.

GUÉRIN, P.; EL MOUATASSIM, S.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**, v.7, n.2, p.175–189, 2001

GUPTA, M. K.; UHM, S. J.; LEE, H. T. Effect of vitrification and beta-mercaptoethanol on reactive oxygen species activity and in vitro development of oocytes vitrified before or after in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, v.93, n.8, p.2602– 2607, 2010.

HAFEZ, E.; HAFEZ, B. Foliculogênese, maturação ovocitária e ovulação. HAFEZ, E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7° ed. São Paulo: Manole, p. 69-81, 2004.

HALLIWELL B.; GUTTERIDGE J. M. C. Free radicals **in biology and medicine**. 3.ed. New York: Oxford, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. The chemistry of oxygen radicals and other derived species. In: Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. (Eds.), **Free Radical Biology and Medicine**. Clarendon Press, Oxford, pp. 22-85, 1989.

HANSEN, K. H.; BRACKEN, A. P.; PASINI, D.; DIETRICH, N.; GEHANI, S. S.; MONRAD, A.; RAPPSILBER, J.; LERDRUP, M.; HELIN, K. A model for transmission of the H3K27me3 epigenetic mark. **Nature Cell Biology**, v.10, n.11, p.1291-1300, 2008.

HAZELEGER, N. L.; STUBBINGS, R. B. Developmental potential of selected bovine oocyte cumulus complexes. **Theriogenology**, v.37, n.1, p. 219, 1992.

HENDRICKS, K. E. M.; HANSEN, P. J. Consequences for the bovine embryo of being derived from a spermatozoon subjected to oxidative stress. **Australian veterinary journal**, v.88, n.8, p.307-310, 2010.

HENDRIKSEN, P. J. M.; STEENWEG, W. N. M.; HARKEMA, J. C.; MERTON, J. S.; BEVERS, M. M.; VOS, P. L. A. M.; DIELEMAN, S. J. Effect of different stages of the follicular wave on in vitro developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.61, n.5, p.909-920, 2004.

HENKEL, R. R.; SCHILL, W. B. Sperm preparation for ART. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.1, p.1-22, 2003.

HOLM, P.; BOOTH, P. J.; SCHMIDT, M. H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. **Theriogenology**, v. 52, n.4, p. 683-700, 1999.

HOSSEIN, M. S.; HASHEM, M. A.; JEONG, Y. W.; LEE, M. S.; KIM, S.; KIM, J. H.; KOO, O. J.; PARK, S. M.; LEE, E. G.; PARK, S. W.; KANG, S. K.; LEE, B. C.; HWANG, W. S. Temporal effects of α -tocopherol and l ascorbic acid on in vitro fertilized porcine embryo development. **Animal Reproduction Science**, v.100, p.107-117, 2007.

HU, J.; CHENG, D.; GAO, X.; BAO, J.; MA, X.; WANG, H. Vitamin C enhances the *in vitro* development of porcine pre-implantation embryos by reducing oxidative stress. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, n.6, p.873–879, 2012.

IETS. Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals. Embryo Transfer Newsletter, v. 32, p. 14-26, 2014.

IRITANI, A.; NIWA K. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 50, n.1, p.119-121, 1977.

KADARMIDEEN, H. N.; MAZZONI, G.; WATANABE, Y. F.; STROBECH, L.; BARUSELLI, P. S.; MEIRELLES, F. V.; CALLESEN, H.; HYTTEL, P.; FERRAZ, J. B. S.; NOGUEIRA, M. F. G. Genomic selection of in vitro produced and somatic cell nuclear transfer embryos for rapid genetic improvement in cattle production. **Animal Reproduction Science**, v.12, p.389-396, 2015.

KASSENS, A.; HELD, A.; SALILEW-WONDIM, D.; SIEME, H.; WRENZYCKI, C.; TESFAYE, D.; SCHELLANDER, K.; HOELKER, M. Intrafollicular oocyte transfer (IFOT) of abattoir-derived and in vitro matured oocytes results in viable blastocysts and birth of healthy calves. **Biology of Reproduction**, v.92, p.1-14, 2015.

KIM, B. K.; JABED, M. A.; KANG, S. R.; KIM, D-E.; HAN, C.-H.; HUH, M. K.; KAMAL, T. Effects of spermatozoa during in vitro meiosis progression in the porcine germinal vesicle oocytes. **Animal Reproduction Science**, v.104, n.1, p.83-92, 2008.

KIM, S. S.; YANG, H. W.; KANG, H. G.; LEE, H. H.; LEE, H. C.; KO, D. S.; GOSDEN, R. G. Quantitative assessment of ischemic tissue damage in ovarian cortical tissue with or without antioxidant (ascorbic acid) treatment. **Fertility and Sterility**, v.82, p.679-685, 2004.

LEIVAS, F. G.; BRUM, D. S.; FIALHO, S. S.; SALIBA, W. P.; ALVIM, M. T. T.; BERNARDI, M. L.; RUBIN, M. I. B.; SILVA, C. A. M. Fetal calf serum enhances *in vitro* production of *Bos taurus indicus* embryos. **Theriogenology**, v.75, n.3, p.429-433, 2011.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.37, n.3, p.293- 303, 2001.

LIMA, I. M. T.; SOUZA, A. L. Desenvolvimento e sobrevivência de embriões no período de pré-implantação: enfoque em ruminantes. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, V.33, p.194-202, 2009.

LONERGAN, P.; KHATIR, H.; PIUMI, F.; RIEGER, D.; HUMBLLOT, P.; BOLAND, M. P. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, Sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 117, p. 159-167, 1999.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; WARD, F.; BOLAND, M. P. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. **Reproduction Nutrition Development**, v.41 (2001), n.5, p.427-437, 2002.

LUCK, M. R.; JEYASEELAN, I.; SCHOLLES, R. A. Ascorbic acid and fertility. **Biology Reproduction**, v.52, p.262-266, 1995.

LUVONI, G. C.; KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B. G. Improvement in bovine embryo production in vitro by glutathione – containing culture média. **Molecular Reproduction and Development**, v.43, n.4, p.437 – 443, 1996.

MACHADO, C. I. I. U. F.; GUIMARÃES, A. C. G.; GONÇALVES, C. G. M.; GIOTTO, A. B.; LEIVAS, F. G.; BRUM, D. S. Influência do sêmen de diferentes touros sobre as taxas de fecundação *in vitro* e desenvolvimento de embriões. **Anais ...** In: Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, Universidade Federal do Pampa, v. 4, n.2, 2012.

MACHADO, E. S.; CÉZAR, J. M.; OLIVEIRA, L.; TEIXEIRA, L. S.; LIMA, T. A. Técnicas de melhoramento genético em bovinos para o aumento na produção de leite. **Interfaces Científicas – Saúde e Ambiente**. São Paulo. v.2, p.81-87, 2014.

MACHATY, Z.; PEIPPO, J.; PETER, S. Production and manipulation of bovine embryos: Techniques and terminology. **Theriogenology**, v.78, n.5, p.937-950, 2012.

MAO, L.; LOU, H.; LOU, Y.; WANG, N.; JIN, F. Behaviour of cytoplasmic ganelles and cytoskeleton during oocyte maturation. **Reproductive Biomedicine Online**, v.28, n.3, p.284-299, 2014.

MARTELLI, F.; NUNES, F. M. F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Ciência e Cultura**, v.66, n. 3, p.54-57, 2014.

MARTINEZ, I. N.; SOUZA, L. C. **Transferência de embrião e fertilização *in vitro* (FIV) em bovinos**. Pós-Graduação (Especialização em Produção e Reprodução Bovina) – Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro, p.88, 2007.

MATOS, D. G.; GASPARRINI, B.; PASQUALINI, S. R.; THOMPSON, J. G. Effect of glutathione synthesis stimulation during *in vitro* maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. **Theriogenology**. v.57, n. 5, p. 1443-1451, 2002.

MCKIERNAN, S. H.; BAVISTER, B. D. Different lots of bovine serum albumin inhibit or stimulate *in vitro* development of hamster embryos. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, v.28, n.2, p.154-156, 1992.

MELO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; SOUSA, S. L. G.; MELLO, M. R. B.; PALHANO, H. B. Produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte- MG, v.40, n.2, p.58-64, 2016.

MENCHACA, A.; BARRERA, N.; DOS SANTOS-NETO, P. C.; CUADRO, F.; CRISPO, M. Advances and limitations of *in vitro* embryo production in sheep and goats. **Animal Reproduction**, v. 13, p. 273-278, 2016.

MINGOTI, G. Z. Aspectos técnicos da produção *in vitro* de embriões bovinos. In: Tópicos Avançados em Biotecnologia da Reprodução. Jaboticabal, SP. 2005.

MINGOTI, G. Z.; GARCIA, J. M.; ROSA-E-SILVA, A. A. M. Steroidogenesis in cumulus cells of bovine cumulus–oocyte-complexes matured *in vitro* with BSA and different concentrations of steroids. **Animal Reproduction Science**, v.69, n. 3, p.175-186, 2002.

MIRANDA, M. S.; CARVALHO, C. M. F.; CORDEIRO, M. S.; SANTOS, S. S. D.; OHASHI, O. M. Sistemas alternativos de incubação e meios de cultivo para produção

in vitro de embrião bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n.2, p. 218-223, 2007.

MONTEIRO, S. C.; MATTÉ, C.; BAVARESCO, C. S.; NETTO, C. A.; WYSE, A. T. S. Vitamins E and C pretreatment prevents ovariectomy-induced memory deficits in water maze. **Neurobiology Learn Mem**, v.84, p.192-199, 2005.

MOURA, A. A.; MEMILI, E. Aspectos funcionais do plasma seminal e proteínas espermáticas e seu potencial como marcadores moleculares da fertilidade. **Anais**. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu, v.30, p.88-96, 2016.

MORAES, M. E. B. Produção *in vitro* de embriões bovinos suplementada com antioxidantes: Efeitos no desenvolvimento embrionário e na taxa de prenhez. Programa de Pós-graduação Stricto Sensu Mestrado em Saúde e Produção de Ruminantes. Arapongas: UNOPAR, p. 68, 2018.

NANDI, S.; RAGHU, H. M.; RAVINDRANATHA, B. M.; CHAUHAN, M. S. Production of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos in vitro: Premises and Promises. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, n.2, p.65-74, 2002.

NEGLIA, G.; GASPARINI, B.; VECCHIO, D.; BOCCIA, L.; VARRICCHIO, E.; DI PALO, R.; ZICARELLI, L.; CAMPANILE, G. Long term effect of Ovum Pick-up in buffalo species. **Animal Reproduction Science**, v.123 (3-4), p.180-186, 2011.

NEDAMBALE, T. L.; DU, F.; XU, J. Prolonging bovine sperm-oocyte incubation in modified medium 199 improves embryo development rate and the viability of vitrified blastocysts. **Theriogenology**, v.66, n.8, p.1951-1960, 2006.

NEVES, M. F.; SIMPRINI, E.; MILAN, P. Estudo de Atratividade do Polo de Excelência em Genética Bovina. In: CENTRO DE INTELIGÊNCIA EM GENÉTICA BOVINA. *Pesquisas e estudos*. Uberaba,[2010] Disponível em: <<http://cigeneticabovina.com.br/pe/6f46f451e506ba21fdc300190dd53256.pdf>>.

NIKSERESHT, M.; TOORI, M. A.; RAHIMI, H. R.; FALLAHZADEH, A. R.; KAHSHANI, I. R.; HASHEMI, S. F.; BAHRAMI, S.; MAHMOUDI, R. Effect of Antioxidants (beta-mercaptoethanol and Cysteamine) on Assisted Reproductive Technology In vitro. **J Clin Diagn Res**, v.11, n.2, p.10-14, 2017.

OIKAWA, T.; ITAHASHI, T.; NUMABE, T. Improved embryo development in Japanese black cattle by in vitro fertilization using ovum pick-up plus intracytoplasmic sperm injection with dithiothreitol. **Reproduction and Development**, v.62, p.11-16, 2016.

OLSON, S. E.; SEIDEL JR, G. E. Culture of in vitro-produced bovine embryos with vitamin E improves development in vitro and after transfer to recipients. **Biology of Reproduction**, v.62, p.248-252, 2000.

PALMA, G.A. Producción *in vitro* de embriones bovinos. **Anais...**In: Encontro sul americano de pecuária de leite, Pelotas, 2001.

PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v.44, p.859-869, 1995.

PASZKOWSKI, T.; CLARKE, R. N. The Graafian follicle is a site of L-ascorbate accumulation. **Journal Assist. Reprod. Genet.** V.16, p.41-45, 1999.

PEREIRA, E. C. M.; BORGES, A. M.; OBA, E. Maturação in vitro de oócitos bubalinos e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.40, n.2, p.43-50, 2016.

PONTES, J.; NONATO-JÚNIOR, I.; SANCHES, B.; ERENO-JÚNIOR, J.; UVO, S.; BARREIROS, T.; OLIVEIRA, J.; HASLER, J.; SENEDA, M. Comparison of embryos yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v.71, p. 690-697, 2009.

POZZOBON, S. E. **Ascorbic acid in the in vitro production of bovine embryos**. 62 p. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária) Santa Maria: UFSM - RS, 2008.

PRASAD, A. S.; BECK, F. W. J.; BAO, B.; FITZGERALD, J. T.; SNELL, D. C.; STEINBERG, J. D.; CARDOZO, L. J. Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.85, n.3, p.837-844, 2007.

ROCHA-FRIGONI, N. A. S.; LEÃO, B. C. S.; DALL'ACQUA, P. C.; MINGOTI, G. Z. Improving the cytoplasmic maturation of bovine oocytes matured in vitro with intracellular and/or extracellular antioxidants is not associated with increased rates of embryo development. **Theriogenology**, v.86, n.8, p.1-9, 2016.

RODRIGUES, G. Q.; BRUNO, J. B.; FAUSTINO, L. R.; SILVA, C. M. G.; FIGUEIREDO, J. R. Suplementação proteica no meio de cultivo in vitro de folículos pré-antrais. **Acta Scientiae Veterinariae**. Porto Alegre. v.38, p.341-349, 2010

ROOVER, R.; FEUGANG, J M. N.; BOLS, P. E. J.; GENICOT, G.; HANZEN, C. H. Effects of Ovum Pick-up Frequency and FSH Stimulation: A Retrospective Study on Seven Years of Beef Cattle *In Vitro* Embryo Production. **Reproduction Domestic Animals**, v.10, p. 1439-1531, 2007.

SANTOS, M. V. O.; QUEIROZ NETA, L. B.; BORGES, A. A.; PEREIRA, A. F. Influence of commercially available follicle stimulating hormone on the in vitro maturation of bovine oocytes. **Seminário: Ciências Agrárias**. v.38, n.3, p.1393-1402, 2017.

SCHNEIDER, M. R.; SCHWARTZ, J.; REICHENBACH, H. D.; RODRIGUES, J. L. Short-term storage of in vitro produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 49, p. 249, 1998.

STROEBECK, L.; MAZZONI, G.; PEDERSEN, H. S.; FREUDE, K. K.; KADARMIDEEN, H. N.; CALLESEN, H.; HYTTEL, P. In vitro production of bovine embryos: revisiting oocyte development and application of systems biology. **Anais**,

Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Gramado-RS, v.29, p.148-156, 2015.

STROUD, B.; The year 2011 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. **Embryo Transfer Newsletter**, 2012.

SILVA, C. T.; JASIULIONIS, M. G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciência e Cultura**, v.66, n.1, p.38-42, 2014.

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, n.3, p.315-326, 2011.

SINGHAL, S.; PRASAD, S.; SINGH, B.; PRASAD, J. K.; GUPTA, H. P. Effect of including growth factors and antioxidants in maturation medium used for in vitro culture of buffalo oocytes recovered in vivo. **Animal Reproduction Science**, v. 113 (1-4), p.44-50, 2009.

SIRARD, M. A. 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**, v.8(4), p.411-417, 2017.

SIRARD, M. A.; FLORMAN, H. M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; BARNES, F. L.; SIMS, M. L.; FIRST, N. L. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v.40, n.6, p.1257- 1263, 1989.

SMETANINA, I. G.; TATARINOVA, L. V.; KRIVOKHARDCHENKO, A. S. The effect of the composition of the culture media on bovine oocyte maturation and embryo development in vitro. **Ontogenez**, v.31, n.2, p.139-143, 2000.

SOVERNIGO, T. C.; ADONA, P. R.; MONZANI, P. S.; GUEMRA, S.; BARROS, F.; LOPES, F. G.; LEAL, C. Effects of supplementation of medium with different antioxidants during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. **Reproduction Domestic Animal**, v. 52, n. 4, p. 561-569, 2017.

STRADAIOLI, G; NORO, T; SYLLA, L; MONACI, M. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: Comparison between two extenders. **Theriogenology**, v.67, p.1249-1255, 2007.

TAKAHASHI, T.; SASAKI, K.; SOMFAI, T.; NAGAI, T.; MANABE, N.; EDASHIGE, K. N, N-Dimethylglycine decreases oxidative stress and improves in vitro development of bovine embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v. 62, n.2, p.209-212, 2016.

TARÍN, J. J.; DE LOS SANTOS, M. J.; DE OLIVEIRA, M. N. M.; PELLICER, A.; BONILLA-MUSOLES, F. Ascorbate-supplemented media in short-term cultures of human embryos. **Human Reproduction**, v. 9, n. 9, p. 1717-1722, 1994.

TESSMANN, J. V.; MOZZAQUATRO, F. D.; RAUBER, L. P.; SANTOS, M. V.; CHEQUIM, R. M.; BERNARDI, M. L.; SILVA, C. A. M.; RUBIN, M. I. B. Transporte-

maturação de oócitos bovinos em palhetas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p.177-84, 2004.

THOMAS, F. H.; LEASK, R.; SRSEN, V.; RILEY, S. C.; SPEARS, N.; TELFER, E. E. Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term culture. **Reproduction**, v.122, p.487-495, 2001.

THOMPSON, J. G. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos - a decade of achievement. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.263-275, 2000.

THOMPSON, J. G.; GARDNER, D. K.; PUGH, P. A.; MCMILLAN, W. H.; TERVIT, H. R. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during in vitro pre-elongation development of ovine embryos. **Biology of Reproduction**, V.53, p.1385–1391, 1995.

TIAN, X.; WANG, F.; HE, C.; ZHANG, L.; TAN, D.; Reiter, R. J.; XU, J.; JI, P.; LIU, G. Beneficial effects of melatonin on bovine oocytes maturation: a mechanistic approach. **Journal of Pineal Research**, v.57, n.3, p.239–247, 2014.

TRINDADE, M. C.; MACENTE, B. I.; VICENTE, W. R. R.; APPARICIA, M. Oxidative stress on *in vitro* production of bovine embryos. **Revista Investigação Medicina Veterinária**, v.15, n.1, p.37-47, 2016.

VAN SOOM, A. et al. Prevalence of apoptosis and inner cellallocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition. **Theriogenology**, v. 57, n. 5, p. 1453-1465, 2002.

VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n.2, p.100-109, 2008.

VARAGO, F. C.; SILVA, L. P.; RIBEIRO, J. P.; FERNANDES, C. A.; CARVALHO, B. C.; GIOSO, M. M.; MOUSTACAS, V. S. Teofilina como agente capacitante do sêmen bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69 n. 6, p.1607-1614, 2017.

VEGA W. H. O.; QUIRINO, C. R.; SERAPIÃO, R. V.; OLIVEIRA C. S.; PACHECO, A. Phenotypic correlations between ovum pick-up *in vitro* production traits and pregnancy rates in Zebu cows. **Genetics and Molecular Research**, v.14, p. 7335-7343, 2015.

VIANA J. H. M.; CAMARGO L. S. A. A produção de embriões bovinos no Brasil: Uma nova Realidade. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, Supl. 3, p. 915-924. 2007.

VIANA, J. H. M.; FIGUEIREDO, A. C. S.; SIQUEIRA, L. G. B. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons and expectations for the future. **Animal Reproduction**. v.14, n.3, p.476-481, 2017.

VIANA, J. H. M.; SIQUEIRA, L. G. B.; PALHAO, M. P.; CAMARGO, L. S. A. Features and perspectives of the Brazilian *in vitro* embryo industry. **Animal Reproduction**, v.9, n.1, p.12-18, 2012.

WANG, F.; TIAN, X.; ZHANG, L.; GAO, C.; HE, C.; FU, Y.; JI, P.; LI, Y.; LI, N.; LIU, G. Beneficial effects of melatonin on in vitro bovine embryonic development are mediated by melatonin receptor 1. **Journal of Pineal Research**, v.56, n.3, p.333–342, 2014.

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, n.6, p.1272-1277, 2002.

WATANABE, Y. F.; WATANABE, M. R.; DAYAN, A.; VILA, R. A. The effect of bull on OPU-IVP in zebu cattle. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 27, n.1, p.297, 1999.

WATSON, A. J.; DESOUSA, P.; CAVENEY, A.; BARCROFT, L. C.; NATALE, D.; URQUHART, J.; WESTHUSIN, M. E. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcriptional levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 62, n. 2, p. 355-364, 2000.

WEHREND, A.; MEINECKE, B. Kinetics of meiotic progression, M-phase promoting factor (MPF) and mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) activities during in vitro maturation of porcine and bovine oocytes: species specific differences in the length of the meiotic stages. **Animal Reproduction Science**, v.66 (3-4), p.175-184, 2001.

WIT, A. A. C.; KRUIP, T. A. M. Bovine cumulus-oocyte-complex-quality is reflected in sensitivity for alpha amanitin, oocyte-diameter and developmental capacity. **Animal Reproduction Science**, v.65 (1-2), p.51 – 65, 2001.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; KESKINTEPE, L.; MARTINS, A.; SIRISATHIEN, S.; BRACKETT, B.; NIEMANN, H. Effect of culture system and protein supplementation on mRNA expression. In pre-implantation bovine embryos. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 16, n. 5, p. 893-901, 2001.

YUAN, Y. Q.; VAN SSOM, A.; COOPMAN, F. O. J.; MINTIENS, K.; BOERJAN, M. L.; VAN ZEVEREN, A.; DE KRUIF, A.; PEELMAN, L. J. Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured *in vitro*. **Theriogenology**, v.59, n.7, p.1585-1596, 2003.

CAPÍTULO 2 – ARTIGO 1

Utilização do Ácido Ascórbico na Produção *In Vitro* de Embriões Bovinos

Utilization the Ascorbic Acid in Production of bovine embryos *in vitro*

RESUMO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é a biotecnologia que se tornou apropriada para gerar mais descendentes por procedimento realizado. Porém, por ser uma técnica que permite um número maior de embriões produzidos, estes ainda consisti em ser muito sensíveis comparando com os produzidos *in vivo*. Afim de melhorar os resultados e diminuir o estresse oxidativo a utilização de antioxidantes na PIVE tem sido motivo de diversos estudos por pesquisadores. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do ácido ascórbico na produção *in vitro* de embriões bovinos, desde a maturação até a eclosão dos blastocistos. O experimento foi realizado no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (BIOTEC) da Universidade Estadual de Goiás. Os ovários foram provenientes de abatedouro local, e transportados até o laboratório em recipiente térmico onde os mesmos foram lavados e então aspirados. Foram selecionados oócitos de grau I e II para serem utilizados na PIVE. Os oócitos foram divididos em grupos em três grupos AAMIV, AAMC e AACIV, e dentre os grupos foi utilizado ácido ascórbico em três concentrações (10 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL) mais o controle (0 µg/mL ácido ascórbico), submetidos a maturação por 24 horas com meio suplementado com ácido ascórbico no grupo AAMIV e AAMC. Na fertilização *in vitro* utilizou sêmen de um único touro e partida, com fertilidade comprovada e proveniente de central. Os possíveis zigotos permaneceram em cultivo por 11 dias. No cultivo adicionou-se ácido ascórbico ao grupo AACIV e AAMC. Todas as etapas foram realizadas em estufa de cultivo celular a 38,8°C e atmosfera gasosa com 5,5% de CO₂. As análises estatísticas foram realizadas pelo ANOVA, e análise de *Bonferroni* a 5% de significância. A taxa de blastocistos em relação aos clivados (AAMIV², AAMC² e AACIV²), se diferiram ($p < 0,05$) entre si. Portanto as concentrações de 10 µg/mL e 50 µg/mL do grupo AAMIV², foram o que apresentaram os melhores resultados (65,23% e 54,50%), comparando entre os grupos com ácido ascórbico. Comparado a taxa de clivagem nas demais concentrações de ácido ascórbico dos grupos, AAMC¹ na concentração de 10 µg/mL (84,14%), de 50 µg/mL (82,68%), e de 100 µg/mL (84,16%) se diferem ($p < 0,05$) entre si. A taxa de eclosão de blastocisto no D11 de cultivo, não apresentou diferença estatística quando comparada entre os grupos. Por fim, conclui-se que a suplementação de 10 µg/mL de ácido ascórbico apresentou resultados satisfatórios na maturação *in vitro* e na qualidade embrionária.

Palavras-chave: Antioxidante. Fecundação. PIVE. Reprodução animal. Vitamina C

ABSTRACT

In vitro production of embryos (PIVE) is the biotechnology that has become appropriate to generate more offspring per procedure performed. However, being a technique that allows a larger number of produced embryos, they still consist of being very sensitive compared to those produced *in vivo*. In order to improve results and reduce oxidative stress, the use of antioxidants in PIVE has been the subject of several studies by researchers. The objective of this study was to evaluate the effect of ascorbic acid on *in vitro* production of bovine embryos, from maturation to hatching of blastocysts. The experiment was carried out at the Animal Reproduction Biotechnology Center (BIOTEC) of the State University of Goiás. The ovaries came from a local slaughterhouse and transported to the laboratory in a thermal container where they were washed and then aspirated. Grade I and II oocytes were selected for use in PIVE. The oocytes were divided into groups in three AAMIV, AAMC and AACIV groups, and among the groups was used ascorbic acid in three concentrations (10 µg / mL, 50 µg / mL and 100 µg / mL) plus the control (0 µg / mL ascorbic acid), matured for 24 hours with medium supplemented with ascorbic acid in the AAMIV and AAMC group. *In vitro* fertilization used semen from a single bull and broken, with proven fertility and coming from central. The possible zygotes remained in cultivation for 11 days. In cultivation, ascorbic acid was added to the AACIV and AAMC group. All steps were performed in a cell culture greenhouse at 38.8°C and 5.5% CO₂ gas atmosphere. Statistical analyzes were performed by ANOVA and Bonferroni analysis at 5% significance. The rate of blastocysts in relation to the cleaved ones (AAMIV², AAMC² and AACIV²) differed (p < 0,05) from each other. Therefore, the concentrations of 10 µg / mL and 50 µg / mL of the AAMIV² group were the ones that presented the best results (65.23% and 54.50%), comparing between the groups with ascorbic acid. Comparing the cleavage rate in the other ascorbic acid concentrations of the groups, AAMC¹ at a concentration of 10 µg / mL (84.14%), 50 µg / mL (82.68%), and 100 µg / mL (84, 16%) differ (p < 0.05) from each other. The blastocyst hatching rate at D11 of culture did not show statistical difference when compared between groups. Finally, it was concluded that the supplementation of 10 µg / mL ascorbic acid presented satisfactory results in *in vitro* maturation and embryonic quality.

Key-words: Animal reproduction. Antioxidant. Fertilization. PIVE. Vitamin C.

1 INTRODUÇÃO

A PIVE (produção *in vitro* de embriões bovinos) é a biotecnologia adequada para gerar mais descendentes por procedimentos realizados. Por meio da aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU), obtém um grande número de oócitos, conseqüentemente, um número significativo de embriões e animais nascidos, confrontando com a inseminação artificial, sendo que a eficácia de produção por doadora é baixa nascendo um bezerro por ano (GONÇALVES *et al.*, 2008).

Embora seja uma técnica que possibilita um número significativo de embriões produzidos, o mesmo ainda é extremamente sensível quando comparados a embriões produzidos *in vivo* (KHURANA e NIEMANN, 2000). Os procedimentos desde aspiração dos oócitos até a inovulação dos embriões podem lesionar e comprometer as estruturas celulares oocitárias e embrionárias, bem como também induzir a condições de estresse, provocando então uma diminuição da competência de desenvolvimento (ALVES, 2015).

Outro fator de estresse para o oócitos é a tensão de oxigênio das incubadores (20% de Oxigênio) onde são cultivados (LUVONI *et al.*, 1996), sendo maior que o ambiente uterino (2-5% de oxigênio) (AGARWAL *et al.*, 2005; ANDRADE *et al.*, 2010). Essa alta tensão de O₂ acresce a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), podendo alterar a quantidade e qualidade de embriões que serão produzidos.

A PIVE envolve as etapas de coleta dos oócitos, maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo ou co-cultivo *in vitro* (CIV) de embriões fora do útero animal (VARAGO *et al.*, 2008).

O aperfeiçoamento dos métodos de manipulação de oócitos assim como de sêmen na FIV são indispensáveis para alcançar melhores resultados de produção. Diversos fatores podem colaborar com a qualidade dos embriões produzidos *in vitro* e o uso de antioxidantes ao meio de cultivo embrionário é um desses fatores.

Tendo em vista em melhorar a qualidade e a quantidade de embriões produzidos *in vitro*, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da adição de ácido ascórbico ao meio de maturação e/ou cultivo, sobre a produção de embriões bovinos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local e Período de experimento

O experimento foi realizado no Centro de Biotecnologias em Reprodução Animal - BIOTEC da Universidade Estadual de Goiás – UEG, Câmpus São Luís de Montes Belos, localizado na rodovia GO 060, Km 124, em São Luís de Montes Belos –GO. No período de janeiro e fevereiro de 2019.

2.2 Obtenção e Aspiração Folicular dos oócitos

Os ovários utilizados para a realização do experimento foram obtidos de abatedouro e transportados em solução salina 0,9% estéril, em recipiente térmico a 37°C. No BIOTEC, aproximadamente 2 horas após o abate, os ovários passaram duas vezes pela lavagem, em solução enriquecida aquecida (PBS) (37°C). Em seguida, realizada a aspiração dos folículos entre 2 a 8 mm com auxílio de agulha de calibre 18G acoplada a uma seringa de 10 mL (Figura 1). O conteúdo folicular recuperado foi colocado em um tubo cônico de 50 ml e mantido em banho-maria a (37°C) até ser filtrado utilizando o filtro coletor com poros de 75 micras. Posteriormente realizou-se a lavagem dos oócitos utilizando solução salina tamponada fosfatada e os mesmos depositados em placa de cultivo celular de 90 x 15 mm (Corning®). Os conteúdos presentes nas placas foram visualizados e avaliados utilizando esteriomicroscópio, dentro do fluxo laminar para o rastreamento dos oócitos e classificando, aproveitando oócitos de grau I e II no presente experimento.

Em seguida, lavados duas vezes em meio de lavagem (TCM199) e uma vez em meio de maturação, e posteriormente colocados em seus respectivos grupos.

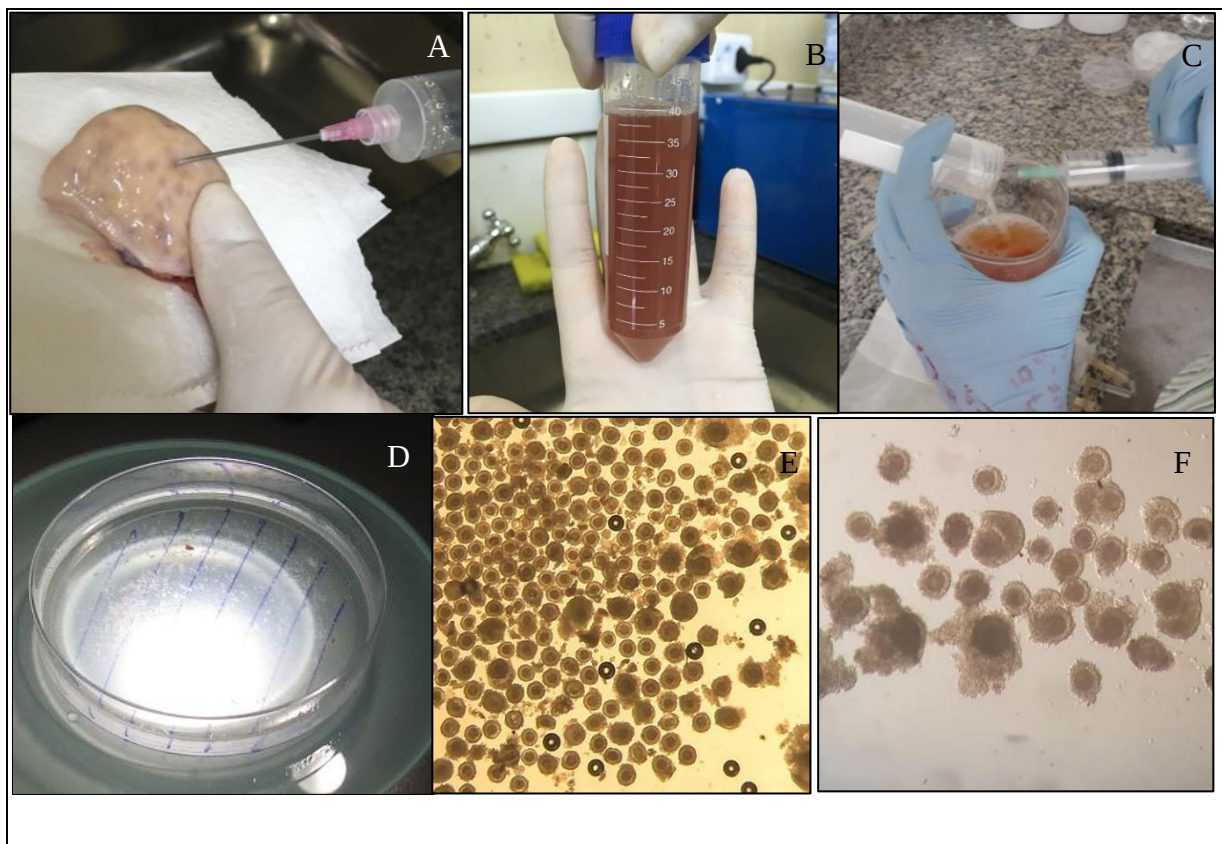


Figura 1. Aspiração folicular com agulha 18G (A), líquido folicular depositado dentro do tubo cônico de 50mL (B), lavagens dos oócitos com solução enriquecida (C), oócitos na placa de cultivo (D), seleção dos oócitos (E) e classificação dos oócitos (F).
Fonte: Arquivo pessoal

2.3 Separação dos grupos

Os oócitos aspirados foram divididos em 3 grupos, AMIV (ácido ascórbico no meio de maturação), ACIV (ácido ascórbico no meio de cultivo) e AMC (ácido ascórbico no meio de maturação e cultivo), com 4 tratamentos cada grupo: controle (sem ácido ascórbico), ácido ascórbico (10 μ g/mL), ácido ascórbico (50 μ g/mL) e ácido ascórbico (100 μ g/mL), 14 repetições para cada grupo, contendo aproximadamente 15 oócitos cada, sendo mantida a mesma proporção de grau I e II.

- Grupo Controle AMIV: sem ácido ascórbico
- Grupo AMIV10: 10 μ g/mL antioxidante
- Grupo AMIV50: 50 μ g/mL antioxidante
- Grupo AMIV100: 100 μ g/mL sem antioxidante

- Grupo AMC Controle: sem ácido ascórbico
- Grupo AMC10: 10µg/mL antioxidante
- Grupo AMC50: 50µg/mL antioxidante
- Grupo AMC100: 100µg/mL antioxidante
- Grupo Controle CIV: sem ácido ascórbico
- Grupo ACIV10: 10µg/mL antioxidante
- Grupo ACIV50: 50µg/mL antioxidante
- Grupo ACIV100: 100µg/mL antioxidante

2.3.1 Diluição e estoque do antioxidante

Para a realização da diluição, preparou-se uma solução estoque para todo o experimento, prevenindo possíveis erros de amostragem. Para solução estoque de antioxidante utilizou a diluição de 1 mg do ácido ascórbico em 1mL de meio MIV e/ou CIV, formando uma solução de 1 µg/mL e concretizou em alíquotas de 200 µL da solução mãe (Tabela 1) e estocada em freezer a -20 °C (ALICIO, 2018).

As alíquotas descongeladas não utilizadas em sua totalidade, foram descartadas evitando comprometer a realização do experimento.

Tabela 1. Diluição e preparação da solução mãe de ácido ascórbico, até atingir as concentrações desejadas, para uso no meio de maturação e/ou cultivo.

Grupos µg/mL	Volume da Solução mãe µL	Volume do meio MIV ou CIV µL*
0 - Controle	0	1000
10	10	990
50	50	950
100	100	900

*As alíquotas foram armazenadas a -20°C, por 2 meses.

2.4 Maturação *in vitro*

Para a maturação utilizou meio de maturação suplementado de acordo com o protocolo do laboratório, composto por TCM 199 (meio de cultura de tecidos), com sais de *Earle*, soro fetal bovino, hormônio luteinizante, hormônio folículo estimulante, piruvato, gentamicina.

Os oócitos cultivados conforme cada grupo decorreu de duas lavagens e transferidos logo após para a placa de Petri de 60mm em gotas de 100 μ L de meio de maturação imersa com óleo mineral estéril cada microgota conteve aproximadamente 15 oócitos mantidos em incubadora de cultura por 24 horas, com atmosfera gasosa de 5,5% de CO₂ em ar, 5% de O₂ a 38,8°C (Figura 2).

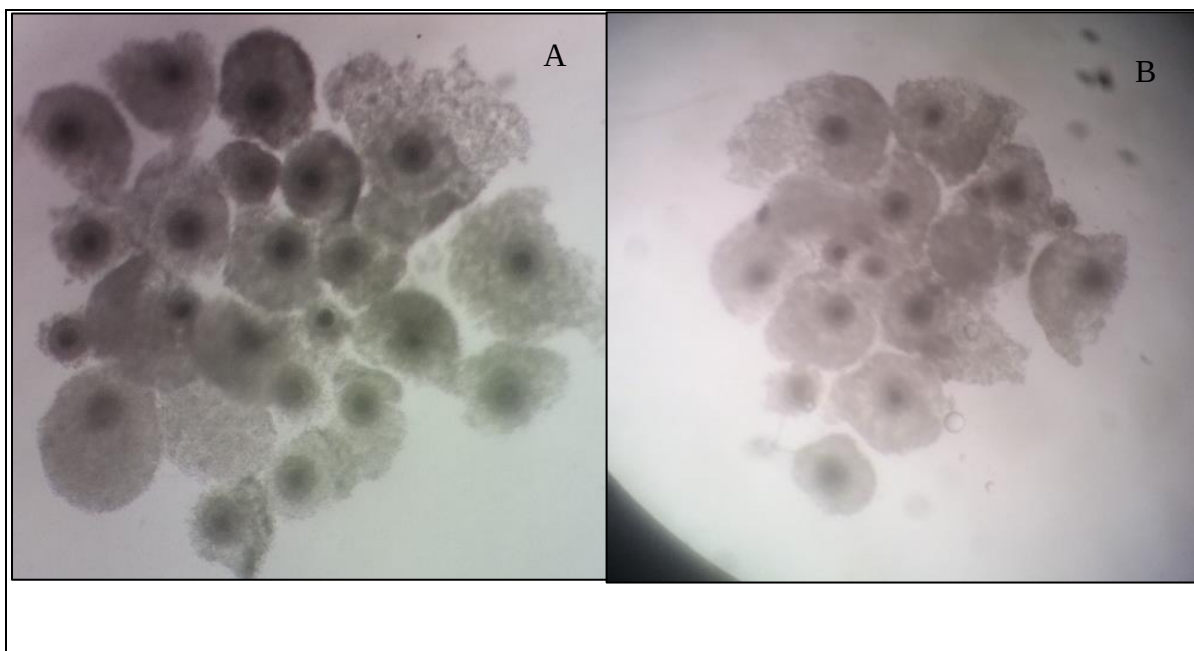


Figura 2. Oócitos maturados após as 24h com ácido ascórbico (A), e oócitos maturados após as 24h sem ácido ascórbico (B).

Fonte: Arquivo pessoal

2.5 Etapas da Fecundação *in vitro*

Para a realização do preparo do sêmen e a fecundação *in vitro* não foi aplicado nenhum tratamento com ácido ascórbico aos grupos.

Após o período de maturação, realizou a lavagem dos oócitos em duas gotas de meios de 80 μ L uma de meio de lavagem e outra de meio TALP na mesma placa de Petri de 100mm (Figura 3). O meio TALP foi suplementado com heparina, piruvato, antibiótico, BSA livre de ácidos graxos e solução PHE de penicilamina, hipotaurina e epinefrina, denominado meio FIV.

Para a realização da fecundação *in vitro* utilizou palhetas de sêmen convencional congelado de 0,50mL de um único touro e única partida de origem

holandesa com fertilidade comprovada e proveniente de central de coleta e processamento de sêmen devidamente registrado no Ministério da Agricultura.

O método usado para separação dos espermatozoides foi o gradiente Percoll®. Adicionou-se 250 µL de Percoll® 90% e sob este 250 µL de Percoll® 45% formando assim um gradiente, mantido em estufa por 2 horas antes de ser utilizado, para equilibrar o mesmo. Descongelou-se o sêmen em banho-maria a 37°C, durante 30 segundos, posteriormente depositado sobre o gradiente de Percoll® e submetido à centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos (Figura 4), descartando o sobrenadante e adicionando 1 mL de meio de CAP e centrifugado a 1000 rpm por 3 minutos para a remoção restante de Percoll®.

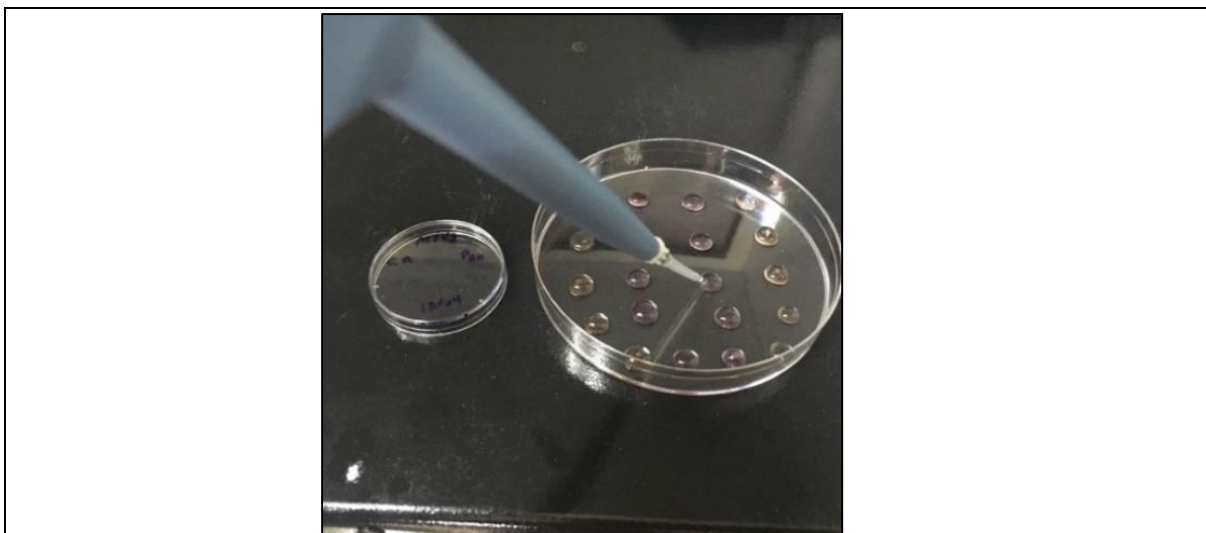


Figura 3. Oócitos maturados sendo lavados em duas gotas, a primeira de meio de Lavagem e a segunda de meio TALP.

Fonte: Arquivo pessoal

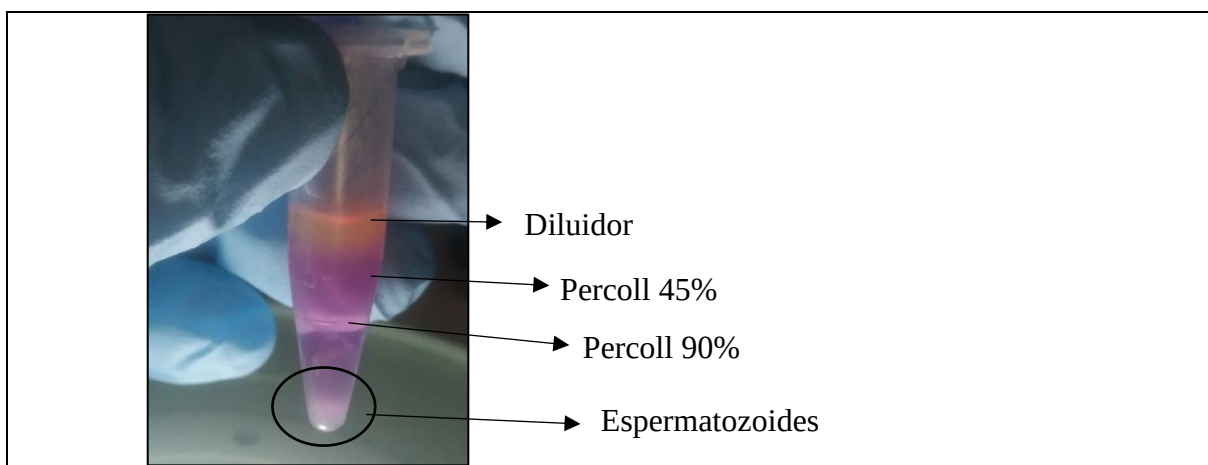


Figura 4 Gradiente Percoll após a primeira centrifugação.

Fonte: Arquivo pessoal

Avaliou-se os pellets quanto a concentração e motilidade espermática, utilizando a câmara de Neubauer em microscópio óptico, e a análise computadorizada (CASA) (Tabela 2, 3, 4), e posteriormente usado para a fecundação dos oócitos.

Tabela 2. Média dos resultados físico químicos, realizado pelo equipamento de análise computadorizada (CASA), de partidas de sêmen utilizados no presente estudo, logo após o descongelamento.

Category	Cells counted	Concentration (M/ml)	Percent
Total	834	93,37	100
Motile	423	48,68	44
Progressive	220	25,25	29

Tabela 3. Média dos resultados físico químicos, realizado pelo equipamento de análise computadorizada (CASA), de partida de sêmen utilizado no presente estudo, logo após a centrifugação com Percoll.

Category	Cells counted	Concentration (M/ml)	Percent
Total	952	83,56	100
Motile	508	43,72	49
Progressive	231	19,62	22

Tabela 4. Média dos resultados físico químicos, realizado pelo equipamento de análise computadorizada (CASA) de partida de sêmen utilizado no presente estudo, logo após a centrifugação com meio de capacitação.

Category	Cells counted	Concentration (M/ml)	Percent
Total	723	68,49	100
Motile	484	44,11	79
Progressive	345	31,15	53

Os oócitos maturados foram transferidos para outra placa de Petri de 60mm com microgotas de 50 µL de meio de fecundação imersa com óleo mineral estéril, adicionado a eles uma concentração de 2×10^6 espermatozoides/mL (5,0 µL) de sêmen, contendo células espermáticas avaliadas e com potencial de fertilidade comprovada. A fecundação ocorreu em incubadora de cultivo sob condições de atmosfera gasosa a 5,5% CO₂, 5% de O₂ com temperatura a 38,8°C por 18 horas.

2.6 Cultivo *in vitro*

Após a fecundação *in vitro* (D0), com o auxílio de um pipetador (100 µL) os possíveis zigotos passaram pelo processo de desnudamento (remoção parcial das células do *cumulus*), lavagem e então transferidos para as microgotas de 80 µL de meio de cultivo *in vitro* cobertas por óleo mineral estéril. Realizou-se o cultivo com Fluido Sintético do Oviduto, contendo soro fetal bovino, gentamicina e albumina sérica bovina de acordo com o protocolo do laboratório e mantidos por 11 dias em incubadora de cultura com atmosfera gasosa de 5,5% CO₂, 5% de O₂ e temperatura de 38,8°C, para a avaliação da cinética embrionária do trabalho.

No cultivo teve adicionou-se ácido ascórbico a um novo grupo (ACIV) dividiu-se em 4 tratamento: controle (sem ácido ascórbico), ácido ascórbico (10µg/mL), ácido ascórbico (50µg/mL) e ácido ascórbico (100µg/mL).

Ao terceiro dia de cultivo (D3) foram realizadas avaliações e a contagem dos embriões clivados, posteriormente realizado o primeiro *feeding* (nutrição, reposição), ou seja, a remoção de 50% de meio e adição de 50% de meio novo, para garantir o aporte nutricional das células. No quinto dia (D5), procedeu o segundo *feeding* (Figura 5 (A)). No sétimo e nono dia de cultivo (D7 e D9) realizou-se avaliações quantitativas e contagens do número de embriões em cada estágio de desenvolvimento embrionário (blastocisto inicial - Bi, blastocisto - Bl, blastocisto expandido - Bx, blastocisto eclodido - Be) (Figura 5 (B)).

No décimo primeiro dia de cultivo (D11) concluiu-se a avaliação e contagem apenas dos Be (Figura 5 (C)).

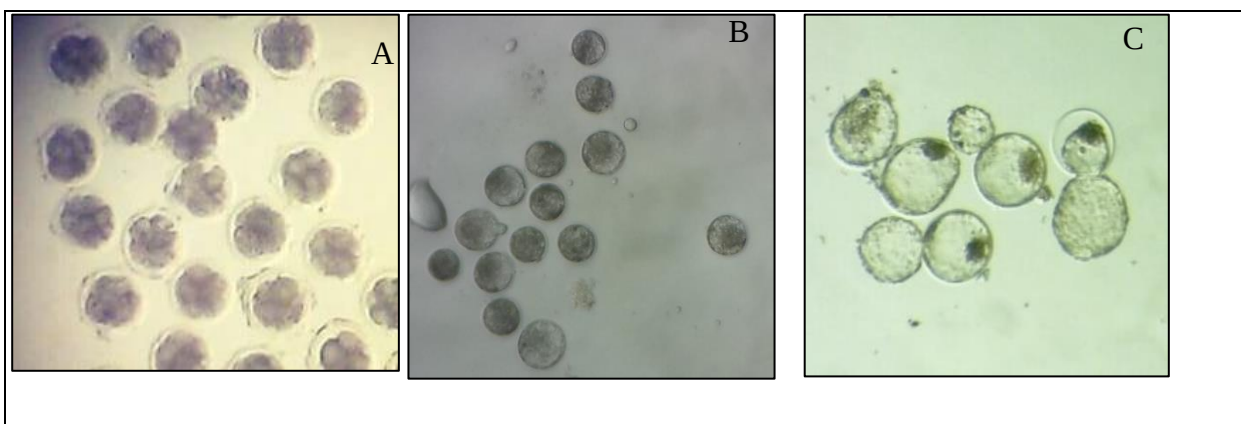


Figura 5. Zigotos em D5 (A), Embriões em diferentes estágios em D7 (B) e embriões eclodidos em D11 (C).

Fonte: Arquivo pessoal

No processo de avaliação quanto a qualidade do embrião levou-se em consideração o aspecto morfológico do embrião, de acordo com o manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), formato, simetria, coloração, extrusão celular e integridade da ZP, a viabilidade e as variações que ocorrem no mesmo durante seu desenvolvimento. Na tabela 5, os embriões do grupo maturação com ácido ascórbico, avaliados conforme sua qualidade.

Tabela 5. Efeito do ácido ascórbico na qualidade embrionária em diferentes concentrações (0 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$) no grupo maturação.

Qualidade embrionária	Grupos $\mu\text{g/mL}$															
	0				10				50				100			
	Bi	Bl	Bx	Ec	Bi	Bl	Bx	Ec	Bi	Bl	Bx	Ec	Bi	Bl	Bx	Ec
Excelente****	5	14	5		7	18	8		3	2						
Bom***	2	4			1	2	2		2	3			1	1	1	
Regular**	1	2	1			3	1		3				2	3	1	
Pobre *	1	1	1		1	1	1		1	5	2			4	2	
Degenerado-		1				1			1	2			3	5	1	

Os meios utilizados estabilizaram por duas horas antes de iniciar qualquer procedimento, exceto o meio de CIV, que separou um dia antes da sua utilização.

Antes da realização da FIV, retirou-se alíquotas de 4 µl do sêmen logo após descongelado, 4 µl após a centrifugação com Percoll® e 4 µl após a centrifugação com meio CAP, submetendo a avaliação computadorizada de característica do movimento espermático pelo aparelho CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*), e posteriormente ter mais confiabilidade no resultado.

2.7 Análise estatística

A maturação, fecundação e cultivo *in vitro* de todos os tratamentos foram conduzidos simultaneamente, sendo efetuadas 14 repetições.

A percentual de oócitos, clivagem e embriões foram transformadas de acordo com a função arco seno (raiz – porcentagens) e os resultados analisados com o programa BioEstats 4.0, aplicado ANOVA e teste *f* de *Bonferroni*. E para evidenciar diferenças significativas entre os tratamentos considerou o valor de 5% de significância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Poucos estudos têm analisado a função do ácido ascórbico na produção *in vitro* de embriões, principalmente na espécie bovina (TARÍN *et al.*, 1994). E para proteger os oócitos e embriões de sofrer estresse oxidativo durante o cultivo *in vitro*. Vários antioxidantes podem ser adicionados ao meio de cultura (ALI *et al.*, 2003). Dessa maneira, o ácido ascórbico tem sido empregado em diversas concentrações (TARÍN *et al.*, 1994), visando diminuir os radicais livres e consequentemente melhorar a produção de embriões (FURNUS *et al.*, 2008).

Neste trabalho para a avaliação do ácido ascórbico na PIVE, os oócitos passaram pela maturação, fecundação e cultivo *in vitro*, contendo antioxidante nas concentrações de 10 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL apenas ao meio de maturação e/ou cultivo. Os resultados do desenvolvimento embrionário *in vitro* estão apresentados na tabela 6 e 7.

Tabela 6. Avaliação da produção *in vitro* de embriões suplementada com ácido ascórbico no meio de maturação (AAMIV), cultivo (AACIV), e maturação/cultivo (AAMC), em diferentes concentrações (10 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL).

	AAMIV	AAMC	AACIV	P
T10 - 1	89,36 ^a	84,14 ^b	89,17 ^a	<0,05
T10 - 2	65,23 ^a	28,62 ^b	19,57 ^b	<0,05
T10 - 3	15,11 ^a	9,37 ^a	8,14 ^a	0,5245
T50 - 1	87,33 ^a	82,68 ^a	85,72 ^a	0,2942
T50 - 2	54,50 ^a	18,05 ^b	10,11 ^b	<0,05
T50 - 3	2,26 ^a	2,26 ^a	4,10 ^a	0,8304
T100 - 1	87,95 ^a	84,16 ^a	85,14 ^a	0,2040
T100 - 2	41,51 ^a	24,83 ^a	27,73 ^a	0,1182
T100 - 3	7,80 ^a	2,53 ^a	5,60 ^a	0,5257

T10¹= (10µl AA) clivados/total de oócitos, T10²= (10µg AA) embriões/ clivados, T10³= 10 µg AA, embriões eclodidos/clivados, T50¹= (50µg AA) clivados/total de oócitos, T50²= (50µg AA) embriões/ clivados, T50³= 50 µg AA, embriões eclodidos/clivados, T100¹= (100µg AA) clivados/total de oócitos, T100²= (100µg AA) embriões/ clivados, T100³= 100 µg AA, embriões eclodidos/clivados. Valores na mesma linha com diferentes letras sobrescritas (^{a, b}) difere entre si (p<0,05).

Avaliando a taxa de blastocistos em relação aos oócitos clivados podemos notar que o grupo AAMIV² no T10-2 (65,23%) apresentou os melhores resultados dentre as concentrações, onde se difere (p<0,05), do AAMC² e AACIV² na concentração de 10 µg/mL e 50 µg/mL de ácido ascórbico.

A taxa de eclosão de blastocisto no 11º dia de cultivo, não apresentou diferença estatística quando comparada apenas entre os grupos tratados com antioxidantes podendo ser observado na tabela 6. Entretanto, quando comparada junto com o controle dos diferentes grupos da tabela 7, pode-se notar que o grupo AACIV³, apresentou diferença significativa (p<0,05) para controle. Porém as taxas obtidas no estudo de SCHNEIDER, *et al.* (1998) com antioxidantes ainda foram superiores as citadas na literatura.

Tabela 7. Avaliação da produção *in vitro* de embriões suplementada com ácido ascórbico no meio de maturação (AAMIV), cultivo (AACIV), e maturação/cultivo (AAMC), em diferentes concentrações (10 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL), mais o controle.

TRATAMENTOS	Concentração de ácido ascórbico (µg por ml)				p
	0	10	50	100	
AAMIV1	91,31 ^a	89,36 ^a	87,33 ^a	87,95 ^a	0,1487
AAMIV2	64,94 ^a	65,23 ^a	54,50 ^{ab}	41,51 ^b	<0,05
AAMIV3	11,44 ^a	15,11 ^a	2,26 ^a	7,80 ^a	0,1213
AAMC1	91,01 ^a	84,14 ^b	82,68 ^b	84,16 ^b	<0,05
AAMC2	62,55 ^a	28,62 ^b	18,05 ^b	24,83 ^b	<0,05
AAMC3	14,14 ^a	9,37 ^a	2,26 ^a	2,53 ^a	0,0637
AACIV1	90,50 ^a	89,17 ^a	85,72 ^a	85,14 ^a	0,0870
AACIV2	59,84 ^a	19,57 ^b	10,11 ^b	27,73 ^b	<0,05
AACIV3	26,52 ^a	8,14 ^b	4,10 ^b	5,60 ^b	<0,05

AAMIV¹= clivados/total de oócitos, AAMIV²= embriões/ clivados, AAMIV³= embriões eclodidos/clivados, AAMC¹= clivados/total de oócitos, AAMC²= embriões/ clivados, AAMC³= embriões eclodidos/clivados, AACIV¹= clivados/total de oócitos, AACIV²= embriões/ clivados, AACIV³= embriões eclodidos/clivados. Valores na mesma linha com diferentes letras sobrescritas (^{a, b}) difere entre si (p<0,05).

Analisando os dados da taxa de clivados em relação ao número total de oócitos, podemos notar que se o grupo AAMIV¹ e AACIV¹ não houve diferença significativa (Tabela 6). No entanto se difere (p<0,05) na concentração de 10 µg/mL entre o grupo AAMIV¹ (89,36%) e AAMC¹ (84,14%), sendo então não indicado a adição de ácido ascórbico na maturação e cultivo (AAMC).

A taxa de blastocistos em relação aos clivados (AAMIV², AAMC² e AACIV²), podemos notar que os grupos se diferem (p<0,05) entre si. Portanto a adição de ácido ascórbico na concentração de 10 µg/mL ao meio de maturação (AAMIV²) foi benéfica para o desenvolvimento de embriões apresentando melhor resultado (65,23%) (Tabela 9) quando comparado com o controle (64,94%) do mesmo grupo. Porém, quando utilizado a mesma concentração ao meio de cultivo, não se obteve resultados significativos. E o trabalho de FERRO *et al.*, (2009), obteve um aumento significativo na taxa de mórula, blastocistos e blastocisto expandidos ao meio de cultivo *in vitro*.

POZZOBON (2008) observou que conforme foi aumentando a concentração de ácido ascórbico ao meio de maturação e/ou cultivo, menor foi a taxa de produção de

blastocistos, e como foi observado neste trabalho (Tabela 6 e 7), exceto para o grupo AACIV² que na medida que teve o aumento da concentração de ácido ascórbico de 10 µg/mL (19,57%) para 100 µg/mL (27,73%) teve um aumento de quase 10% de blastocistos. No entanto, este evento de menor produção de blastocistos pode ter sucedido pelo acúmulo de ácido ascórbico que se tornou prejudicial, ou até mesmo porque a quantidade de EROs neutralizada foi superior a quantidade indispensável para o desempenho celular.

WANG *et al.* (2002) também observaram que o desenvolvimento embrionário foi afetado conforme foi aumentando a concentração de ácido ascórbico ao meio.

Não houve diferença significativa na taxa de eclosão dos blastocistos no dia 11^o entre os grupos com controle (Tabela 7), exceto no grupo AACIV³ comparada ao grupo controle é indicado não adicionar ácido ascórbico ao meio de cultivo, porém levando em conta a qualidade dos blastocistos produzidos no dia 7^o, notamos que o grupo AAMIV se sobressai no quesito qualidade entre os grupos, onde a concentração de 10 µg/mL, apresentou melhor qualidade dos blastocistos (apesar de não significativos).

No entanto, deve-se levar em consideração que o meio controle é provido de alguns oxidantes, e a literatura apresenta como indispensável o uso de antioxidantes na maturação, o que atribui um posterior desenvolvimento até o estágio de blastocisto (FURNUS *et al.*, 2008; SILVA, *et al.*, 2011).

Ainda existe grande discrepância entre autores com relação aos resultados observados na literatura, contudo pode ser esclarecido, pois um elemento pode apresentar efeitos favoráveis no desenvolvimento do embrião em um meio determinado, no entanto não ser eficaz (ou mesmo exercer ação deletéria) em um meio diferente (GUÉRIN *et al.*, 2001).

Neste trabalho não avaliou-se a concentração de radicais livres produzidos no meio de maturação e de cultivo, entretanto, os meios com ácido ascórbico foram produzidos através de uma solução mãe e estocados em freezer a -20° C em alíquotas de 200 µl, antes de serem utilizados, podendo então ter sido expostos ao O₂ por duas vezes antes de serem utilizados, acarretando em maior formação de radicais livres no meio, que por sua vez, pode interferir negativamente a condição de cultivo *in vitro*. Contudo, AVELINO (2000) sugere que para evitar o uso de meios expostos ao O₂,

uma alternativa seria preparar apenas no dia em que fosse utilizar, e de preferência uma hora antes do uso.

4. CONCLUSÃO

Diante do presente estudo, podemos concluir que:

- ✓ A suplementação de 10 µg/mL de ácido ascórbico apresentou resultados satisfatórios na maturação *in vitro*.
- ✓ A utilização de 10 µg/mL de ácido ascórbico ao meio de maturação, apresentou qualidade embrionária superior.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.3, p.28, 2005.

ALI, A. A.; BILODEAU, J. F.; SIRARD, M. A. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. **Theriogenology**, v. 59, n. 3-4, p. 939-949, 2003.

ALVES, L. B. **Produção de embriões *in vitro* com adição de hormônio de crescimento bovino (bGH) ao meio de maturação**. 2015. 34fls. Dissertação (Mestrado- Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal) – Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2015.

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, n.2, p.79-85, 2010.

AVELINO, K.B. **Efeitos de fontes energéticas, antioxidantes e atmosfera gasosa, em meio quimicamente semi-definido no desenvolvimento de embriões bovinos de duas células até blastocisto expandido**. 70p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) Jaboticabal: FCAV-UNESP, 2000.

* Comunicação pessoal de Alicio Martins Junior, em 20 de setembro de 2018, recebida por correio eletrônico.

FERRO, A. C.; DA SILVA, C.; CALEGARI, R. S.; CRESPILO, A. M.; JUNIOR MARTINS, A. Produção de embriões *in vitro* em meio de cultura com ácido ascórbico. **Veterinária e Zootecnia**, v.16, n.1, p. 80-88, 2009.

FURNUS, C.; DE MATOS, D. G.; PICCO, S.; GARCÍA, P. P.; INDA, A. M.; MATTIOLLI, G.; ERRACALDE, A. L. Metabolic requirements associated with GSH synthesis during in vitro maturation of cattle oocytes. **Animals Reproduction Science**, v.109, p.88-99, 2008.

GARCIA, L.; AVELINO, K.; VANTINI, R. Estado da arte da fertilização *in vitro* em bovinos. **Annals of the First International Symposium on Animal Reproduction Applied**, 14 – 16 October, p. 223-230, 2004.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2ª ed. São Paulo – SP: Varela, p.408, 2008.

GUÉRIN, P.; EL MOUATASSIM, S.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**, v.7, n.2, p.175–189, 2001.

KHURANA, N. K.; NIEMANN, H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived *in vitro* or *in vivo*. **Biology of reproduction**, v.62, n.4, p.847-856, 2000.

LONERGAN, P.; KHATIR, H.; PIUMI, F.; RIEGER, D.; HUMBLLOT, P.; BOLAND, M. P. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, Sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 117, p. 159-167, 1999.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; WARD, F.; BOLAND, M. P. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. **Reproduction Nutrition Development**, v.41, n.5, p.427-437, 2001.

LUVONI, G. C.; KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B. G. Improvement in bovine embryo production in vitro by glutathione – containing culture média. **Molecular Reproduction and Development**, v.43, n.4, p.437 – 443, 1996.

MINGOTI, G. Z. Aspectos técnicos da produção in vitro de embriões bovinos. In: Tópicos Avançados em Biotecnologia da Reprodução. Jaboticabal, SP. 2005.

POZZOBON, S. E. **Ascorbic acid in the in vitro production of bovine embryos**. 62 p. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária) Santa Maria: UFSM - RS, 2008.

SCHNEIDER, M. R.; SCHWARTZ, J.; REICHENBACH, H. D.; RODRIGUES, J. L. Short-term storage of in vitro produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 49, p. 249, 1998.

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, n.3, p.315-326, 2011.

SOVERNIGO, T. C.; ADONA, P. R.; MONZANI, P. S.; GUEMRA, S.; BARROS, F.; LOPES, F. G.; LEAL, C. Effects of supplementation of medium with different antioxidants during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. **Reproduction Domestic Animal**, v. 52, n. 4, p. 561-569, 2017.

TARÍN, J. J.; DE LOS SANTOS, M. J.; DE OLIVEIRA, M. N. M.; PELLICER, A.; BONILLA-MUSOLES, F. Ascorbate-supplemented media in short-term cultures of human embryos. **Human Reproduction**, v. 9, n. 9, p. 1717-1722, 1994.

VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n.2, p.100-109, 2008.

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, n.6, p.1272-1277, 2002.

CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção *in vitro* de embriões, aliada a aspiração folicular guiada por ultrassom, é uma ferramenta importante para o melhoramento genético dos rebanhos, aumentando a intensidade de seleção de fêmeas de alto valor genético e diminuindo o intervalo entre gerações, gerando ganhos consideráveis para os criadores. A PIVE visa o aumento de produtividade animal e da pecuária nacional, além dos progressos de grande importância que a aplicação dessa biotecnologia gera para a área da pesquisa.

Porém, a produção *in vitro* de embriões ainda apresenta algumas limitações, como a necessidade de infra-estrutura laboratorial a inconsistências dos resultados referente a taxa de blastocistos, custo operacional, tempo consumido para executar a rotina de produção e distancia do laboratório até a fazenda.

No entanto, as perspectivas para a produção *in vitro* de embriões são boas, pois com o aprimoramento dos sistemas de cultivo *in vitro*, permite também o avanço de outras biotecnologias que estão ascendendo e tendo a PIVE como procedimento padrão.

E perante os resultados obtidos e de acordo com as condições de realização do presente experimento, é de grande importância que os estudos envolvendo a utilização do ácido ascorbico ao meio de maturação e/ou cultivo, continue sendo realizadas, para que se consiga determinar formas mais eficientes de uso na PIVE em bovinos, e assim a técnica continue avançando.