



**Universidade Norte do Paraná**

---

CENTRO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
MESTRADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO DE RUMINANTES

TOBIAS CANAN SOVERNIGO

**USO DE ANTIOXIDANTES NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE  
EMBRIÕES BOVINOS**

TOBIAS CANAN SOVERNIGO

**USO DE ANTIOXIDANTES NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE  
EMBRIÕES BOVINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção de Ruminantes (Programa Associado entre Universidade Estadual de Londrina - UEL e Universidade Norte do Paraná - UNOPAR), como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saúde e Produção de Ruminantes.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Paulo Roberto Adona

Arapongas  
2015

**TOBIAS CANAN SOVERNIGO**

**USO DE ANTIOXIDANTES NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES  
BOVINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção de Ruminantes (Programa Associado entre Universidade Estadual de Londrina - UEL e Universidade Norte do Paraná - UNOPAR), como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saúde e Produção de Ruminantes

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Paulo Roberto Adona  
Universidade Norte do Paraná

---

Prof. Dr. Werner Okano  
Universidade Norte do Paraná

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Mariana Ferreira de Almeida  
Universidade Norte do Paraná

Londrina, 14 de março de 2015.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a minha família, pelo amor e fé.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela oportunidade de estar realizando este trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Roberto Adona por estar disposto a ajudar sempre.

A todos os professores que formam a equipe do mestrado de Saúde e Produção de Ruminantes, em especial ao Prof. Dr. Werner Okano, que esteve sempre disposto a ajudar, aconselhar, escutar e acima de tudo, apoiar minha caminhada.

Agradeço aos meus colegas pelas palavras amigas nas horas difíceis, pelo auxílio nos trabalhos nas dificuldades e principalmente por estarem comigo nesta caminhada tornando-a mais fácil e agradável, em especial a Camila pela incansável ajuda, ao Denis, pelo companheirismo, Marcela, Leila e Jean por fazerem parte da minha família UNOPAR.

A minha família, pelo incentivo e colaboração, principalmente nos momentos de dificuldade.

Ao colega e amigo de laboratório Samuel, pela ajuda no desenvolvimento desse projeto.

A Agropecuária Laffranchi e a Universidade Norte do Paraná por conceder à infraestrutura e a CAPES pelo apoio financeiro ao projeto.

**Muito obrigado!**

**“A mesma rocha que bloqueia meu caminho,  
poderá funcionar como um degrau”**

**(Osho)**

SOVERNIGO, Tobias. **Uso De Antioxidantes Na Produção *In Vitro* De Embriões Bovinos**. 2015. Dissertação de Mestrado Acadêmico Saúde e Produção de Ruminantes (Mestrado de Saúde e Produção de Ruminantes) – Universidade Norte do Paraná, Arapongas, 2015.

### Resumo

A técnica de fertilização *in vitro* se apresenta muito bem consolidada, porém a busca por novas ferramentas, para incrementar os resultados, são incessantes. As drogas antioxidantes vêm sendo estudadas por muitos pesquisadores, pois seus efeitos podem ser a chave para a diminuição do estresse oxidativo, que é uma realidade na produção *in vitro* (PIV) de embriões. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de cinco drogas antioxidantes (quercetina; cisteamina; carnitina; vitamina-C e resveratrol) na PIV de embriões, desde a clivagem, blastocistos, eclosão, número total de células e as mensurações dos níveis das espécies reativas de oxigênio (ROS) e da glutathiona (GSH). As análises estatísticas foram realizadas pelo programa BioEstat 4.0 e, em seguida, pela análise de Bonferroni a 5% de significância. Os oócitos foram recuperados de ovários provenientes de abatedouro e selecionados como grau I e II para serem usados na PIV. Os oócitos foram divididos em seis grupos e submetidos a maturação por 22 horas em meio suplementado com antioxidante (tratamento) ou não (controle). Após a maturação os oócitos foram fecundados e cultivados *in vitro*. Todas as etapas foram em estufa de cultivo celular a 38,5°C e atmosfera gasosa com 5% de CO<sub>2</sub>. A suplementação do meio de maturação com os antioxidantes não alterou significativamente a media nas taxas de clivagem (86.3%), de blastocistos (52%) e de blastocistos eclodidos (59,4%). Porém houve aumento no número total de células (blastômeros) nos grupos tratados com cisteamina (159), carnitina (148), vitamina-C (157) e resveratrol (148) em relação aos grupos controle (126) e o tratado com quercetina (131). Na avaliação dos níveis de ROS na maturação dos oócitos, houve redução de ROS nos grupos tratados com quercetina (0,86), vitamina-C (0,86) e resveratrol (0,91), em relação aos grupos cisteamina (0,98), carnitina (0,98) e controle (1,00). Já o nível de GSH aumentou nos grupos tratados cisteamina (1,25) e carnitina (1,11) em relação aos demais grupos: quercetina (1,02), vitamina-C (1,04), resveratrol (0,98) e ao grupo controle (1,00). De acordo com os resultados a suplementação da maturação *in vitro* com drogas antioxidantes pode interferir positivamente na produção *in vitro* de embriões bovinos.

**Palavras-chave:** Quercetina, Vitamina C, Resveratrol, Cisteamina, Carnitina.

SOVERNIGO, Tobias. **Use of Antioxidants in Production of bovine embryos *in vitro***. 2015. Dissertação de Mestrado Acadêmico Saúde e Produção de Ruminantes (Mestrado de Saúde e Produção de Ruminantes) – Universidade Norte do Paraná, Araçongas, 2015.

### **Abstract**

The *in vitro* fertilization technique performs very well established, but the search for new tools to enhance the results are endless. The antioxidant drugs have been studied by many researchers because its effects can be the key to reduction of oxidative stress, which is a reality in *in vitro* production (IVP) embryos. The objective of this study was to evaluate the effect of five antioxidant drugs (quercetin; cysteamine; carnitine; vitamin-C and resveratrol) in IVP embryos, from the cleavage, blastocyst, hatching, total number of cells and measurements of the levels of reactive species oxygen (ROS) and glutathione (GSH). Statistical analyzes were performed by BioEstat 4.0 program and then by Bonferroni analysis at 5% significance level. Oocytes were recovered from slaughterhouse ovaries and selected as a grade I and II for use in PIV. Oocytes were divided into six groups and subjected to aging for 22 hours in medium supplemented with antioxidant (treatment) or not (control). After maturation oocytes were fertilized and cultured *in vitro*. All steps were in cell culture incubator at 38.5 ° C and the gaseous atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. The supplementation of maturation medium with antioxidants did not significantly alter the media in cleavage rates (86.3%), blastocyst (52%) and hatched blastocyst (59.4%). But there was an increase in the total number of cells (blastomeres) in the groups treated with cysteamine (159), carnitine (148), vitamin-C (157) and resveratrol (148) compared to the control group (126) and treated with quercetin ( 131). In assessing the levels of ROS in the maturation of the oocytes, a reduction of ROS in groups treated with quercetin (0.86), vitamin-C (0.86) and resveratrol (0.91) groups compared to cysteamine (0.98), carnitine (0.98) and control (1.00). But the level of GSH increased in cysteamine treated groups (1.25) and carnitine (1.11) compared to the other groups: quercetin (1.02), vitamin-C (1.04), resveratrol (0.98) and the control group (1.00). According to the results supplementation of maturation *in vitro* antioxidant drugs could positively affect the *in vitro* production of bovine embryos.

**Keywords:** Quercetin, Vitamin C, Resveratrol, Cisteamin, Carnitine.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Reações químicas que resultam na formação das espécies reativas de oxigênio. Modificado de Ferreira e Matsubara (1997)..... 18
- Figura 2** – Embrião corado com Hoechst 33342, para contagem de células, (A) Embrião corado, (B) embrião com todas as células marcadas - contagem de células embrinarias Ou blastoneros.....28
- Figura 3** – Níveis de espécie reativa de oxigênio em oócitos bovinos maturados com diferentes antioxidantes..... 29
- Figura 4** – Imagem ilustrativa dos oócitos corados com H<sub>2</sub>DCFDA para avaliação dos níveis de espécie reativa de oxigênio intracelular. A figura A tem altos níveis de espécie reativa de oxigênio intracelular e a figura B tem baixos níveis de espécie reativa de oxigênio.....30
- Figura 5** – Níveis de glutathiona em oócitos bovinos maturados com diferentes antioxidantes.....30
- Figura 6** – Imagem ilustrativa dos oócitos corados com Cell tracker blue..... 30

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Diluição e estoques das substâncias antioxidantes ..... 24

**Tabela 2** – Uso de diferentes tipos de antioxidantes na produção *in vitro* de embriões e seus efeitos para a competência do desenvolvimento e qualidade embrionária..... 28

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 HIPÓTESE</b> .....	15
<b>3 OBJETIVO</b> .....	15
3.1 Objetivo geral .....	15
3.2 Objetivo específico .....	15
<b>4 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
4.1 Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos .....	16
4.2 Estresse oxidativo .....	17
4.3 Espécie reativa de oxigênio .....	18
4.4 Superóxido ( $O_2^-$ ) .....	18
4.5 Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) .....	19
4.6 Hidroxila ( $OH^\circ$ ) .....	19
4.7 Glutathiona (GSH).....	19
4.8 Antioxidantes.....	20
4.9 Quercetina.....	21
4.10 Cisteamina.....	21
4.11 Carnitina.....	22
4.12 Vitamina-C.....	22
4.13 Resveratrol.....	23
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
5.1 Coleta e seleção do oócitos.....	23
5.2 Diluição e estoque das substâncias antioxidantes.....	24
5.3 Maturação <i>in vitro</i> .....	24
5.4 Fertilização <i>in vitro</i> .....	24
5.4.1 Preparação do sêmen .....	24
5.4.2 Meio de fecundação.....	25
5.5 Cultivo <i>in vitro</i> .....	25

5.6 Níveis de glutathiona e espécie reativa de oxigênio.....	26
5.7 Número de células .....	27
5.8 Análise estatística .....	28
<b>6 Resultados.....</b>	<b>28</b>
<b>7 Discussão.....</b>	<b>30</b>
<b>8 Conclusão .....</b>	<b>33</b>
<b>9 Referências.....</b>	<b>34</b>
<b>10 Anexos.....</b>	<b>44</b>

## 1. Introdução

O Brasil apresenta o maior rebanho comercial bovino e expressiva participação no mercado mundial (IBGE, 2013). As biotecnologias aplicadas à reprodução obtiveram nos últimos anos expressivo crescimento neste contexto. Em virtude desta participação, o Brasil é o maior produtor de embriões bovinos produzidos *in vitro* do mundo e segundo maior produtor de embriões bovinos *in vivo* (Stroud, 2007). Em 2011, cerca de 90% dos embriões produzidos no Brasil eram frutos de fertilização *in vitro*, representando um aumento de 15% em relação ao ano de 2010.

As biotecnologias da reprodução são utilizadas no intuito de maximizar o potencial reprodutivo e se faz necessária na cadeia produtiva da carne e leite. A produção *in vitro* de embriões apresenta-se como umas das principais ferramentas de grande potencial multiplicador de indivíduos de alto potencial genético. Neste sentido a produção *in vitro* consiste numa importante alternativa para disseminar a genética. Atualmente, é considerada uma biotécnica consolidada, e está se tornando mais acessível com o decorrer do tempo (Hansen *et al.*, 2006).

Esta técnica apresenta inúmeras vantagens na produção de bovinos, dentre elas, melhoramento genético, produção de um grande número de embriões por vaca; uma maior pressão genética e a diminuição do intervalo entre gerações. Em contra partida, há também algumas limitações no âmbito da produção, onde há busca incessante por melhorias nos processos envolvidos na produção *in vitro* de embriões (Gottardi *et al.*, 2012).

Os grandes avanços obtidos na produção *in vitro* de embrião são decorrentes de inúmeras pesquisas que são desenvolvidas visando uma melhora nas condições de maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário *in vitro* (Assumpção *et al.*, 2002). Estas pesquisas tendem aproveitar os gametas femininos que possivelmente não atingiram a ovulação *in vivo*, vislumbrando uma maior produção de embriões viáveis (Gottardi e Mingoti 2009). Mesmo com as inúmeras pesquisas e diversas conquistas no âmbito da produção *in vitro* de embrião, a produção *in vitro* de embriões bovinos é de qualidade inferior àqueles produzidos *in vivo* (Chaves *et al.*, 2010). Fato este, que pode estar relacionado com a qualidade dos meios de cultivo utilizados na produção *in vitro* de embrião (Lonergan *et al.*, 2000). Acredita-se, também, na baixa qualidade embrionária derivada do ambiente atmosférico e presença de agentes químicos (Yang *et al.*, 1998)

Em geral, nos protocolos de produção de embriões *in vitro*, são empregadas altas quantidades de O<sub>2</sub> (20%) o que aumenta consideravelmente a quantidade de ROS (do inglês *reactive oxygen species*), que são altamente deletérias e causam injúrias celulares (Andrade *et al.*, 2010), levando em consideração que *in vivo* o trato reprodutivo da fêmea contém apenas 1/3 dessa quantidade de O<sub>2</sub> (3 a 9% de O<sub>2</sub>). Diante disso, faz-se necessário a utilização de antioxidantes na produção de embriões, visando a redução da quantidade de espécie reativa de oxigênio durante a produção de embriões *in vitro* (De Matos *et al.*, 2002).

## **1. Hipóteses**

A adição de agentes antioxidantes na maturação *in vitro* de oócitos, melhora a produção *in vitro* de embriões.

## **2. Objetivo**

### **3.1. Objetivo geral**

O presente estudo teve por objetivo avaliar a produção *in vitro* de embriões suplementando o meio de maturação *in vitro* com substâncias antioxidantes.

### **2.2. Objetivos específicos**

- (i) Avaliar a taxa de clivagem, desenvolvimento embrionário, eclosão e o número total de células dos embriões de oócitos maturados em *in vitro* suplementados com diferentes antioxidantes (quercetina, cisteamina, carnitina, vitamina-C e resveratrol).
- (ii) Mensurar a concentração de espécie reativa de oxigênio intracelular de oócitos maturados em *in vitro* suplementados com diferentes antioxidantes.
- (iii) Mensurar a concentração de glutatona intracelular de oócitos maturados em *in vitro* suplementados com diferentes antioxidantes.

## 4. Revisão de literatura

### 4.1. Produção *in vitro* de embriões Bovinos

O Brasil é o primeiro país em número de produção de embriões *in vitro* do mundo. Em virtude disto, as pesquisas com fêmeas como alvo de aproveitamento dos gametas são mais comuns. Sabe-se que as fêmeas bovinas possuem ao nascimento mais de 100.000 oócitos e na puberdade este número desce para aproximadamente 70.000 oócitos em seus ovários (Hafez, 2004). Durante a fase reprodutiva, alguns folículos são recrutados e os oócitos começam a crescer e maturar. No entanto, de todo esse potencial *in vivo*, somente um oócito será ovulado, e o restante sofrerá atresia (Hardy *et al.*, 2000). Assim, a produção *in vitro* de embriões se apresenta como uma técnica alternativa para incrementar o uso de oócitos bovinos (Bousquet *et al.*, 1999). Deste modo, a técnica de produção *in vitro* de embriões tem o potencial de resgatar os oócitos imaturos ainda no ovário e cultivá-los *in vitro* até o estágio de blastocisto, quando estarão aptos à transferência a receptoras previamente sincronizadas (Chaves *et al.*, 2010).

Três passos biológicos que ocorrem *in vivo* são realizados em laboratório para a produção de embriões após a recuperação dos oócitos: maturação *in vitro* (MIV) dos oócitos, fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) (Thompson, 2000).

A primeira e talvez uma das etapas mais importantes, consiste na maturação oocitária, no qual pode ser a etapa determinante para o sucesso da produção *in vitro*. Apesar de ser inferior a maturação *in vivo*, a maturação *in vitro* vem tendo grandes avanços, podendo chegar a mais de 90% de sucesso (Gilchrist, 2011).

No processo de maturação, os oócitos sofrem modificações nucleares e citoplasmáticas, marcadas pelo reinício do ciclo celular e estimuladas pela ação de hormônios gonadotróficos (Merton *et al.*, 2003). A fase de progressão dos oócitos é iniciada na prófase I, evoluindo para metáfase I, anáfase I, telófase I, terminando na metáfase da segunda divisão meiótica (Meinecke *et al.*, 2001).

Apesar da maturação *in vitro* ainda ser inferior a maturação *in vivo* (Adona e Leal, 2004), diversos estudos vem sendo feitos para maximizar a técnica. Algumas particularidades do processo envolvem a atmosfera gasosa, temperatura, suplementação proteica, fatores de crescimento e até mesmo a manipulação (Garcia *et al.*, 2004).

O cultivo *in vitro* corresponde à etapa de desenvolvimento do oócito fertilizado até o estágio de blastocisto (Sangild *et al.*, 2000), passando por diferentes fases como: ativação do

genoma embrionário, divisão celular, compactação dos blastômeros no estágio de mórula, início da diferenciação embrionária, formação da blastocele (Hoshi, 2003).

Diversos estudos vêm sendo realizados em relação as condições e aos meios de cultivo dos embriões, a composição dos meios de cultivo, e condições de temperatura e atmosfera gasosa, a adição de aminoácidos, vitaminas, antioxidantes, macromoléculas e fatores de crescimento, assim como o uso de soro são fatores determinantes para o cultivo embrionário (Nagai, 2001). O desenvolvimento embrionário *in vitro* é avaliado no 6º dia de cultivo visualizando-se a compactação dos blastômeros e início da formação da blastocele, sendo que no 7º dia é feita a seleção e avaliação final dos embriões para a transferência a fresco ou para congelamento (Thompson, 2000).

## 4.2. Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é consequência de um desequilíbrio na quantidade espécie reativa de oxigênio, as quais são também comumente denominadas radicais livres, e a quantidade de agentes antioxidantes, com predominância da primeira (Agarwal *et al.*, 2005).

Esse desequilíbrio pode ser causado por diversos fatores relacionados com o aumento da produção de espécie reativa de oxigênio e/ou a redução da disponibilidade de antioxidantes. Nos sistemas de cultivo *in vitro*, o estresse oxidativo consiste numa das principais causas da baixa eficiência da maturação oocitária e desenvolvimento embrionário em várias espécies (Luberda, 2005).

Naturalmente ocorre a produção de espécie reativa de oxigênio no processo de metabolismo aeróbico (Guérin *et al.*, 2001), de modo que podem ser encontradas em todos os tipos celulares. Quando em equilíbrio as espécie reativa de oxigênio atuam de forma benéfica, como moléculas sinalizadoras em processos fisiológicos, como na regeneração tecidual, sinalização hormonal, esteroidogênese, regulação redox intracelular e embriogênese (Agarwal *et al.*, 2008), em contra partida, quando há espécie reativa de oxigênio em excesso, os efeitos passam a ser prejudiciais às células, acarretando em alterações e morte celular (Agarwal *et al.*, 2005).

Além do metabolismo intracelular, o estresse oxidativo também pode ser favorecido pelas condições ambientais às quais oócitos e embriões são submetidos durante a produção *in vitro* de embriões. Tais condições envolvem a concentração de oxigênio, presença de espermatozoides, constituintes do meio e exposição à luz ou calor (Guérin *et al.*, 2001).



### 4.3. Espécie Reativa de Oxigênio

As Espécies reativas de oxigênio (ROS) 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 um grande número de compostos que estejam próximos. Eles podem exercer a função de agentes oxidantes, atuando como receptores de elétrons, ou de agentes redutores, atuando como doadores de elétrons (Agarwal *et al.*, 2005).

A mitocôndria é o principal local de produção de espécie reativa de oxigênio (Barja, 2007). Durante a respiração celular, a molécula de oxigênio ( $O_2$ ) deve receber quatro elétrons e ser completamente reduzida a duas moléculas de água ( $H_2O$ ). Se o  $O_2$  for parcialmente reduzido pela recepção de somente um elétron, o produto desta redução será o radical superóxido ( $O_2^-$ ). 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 do radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ), considerado o mais reativo (Figura 1). Este último também poder ser formado pela reação entre o peróxido de hidrogênio e superóxido (Ferreira e Matsubara, 1997; Gate *et al.*, 1999).

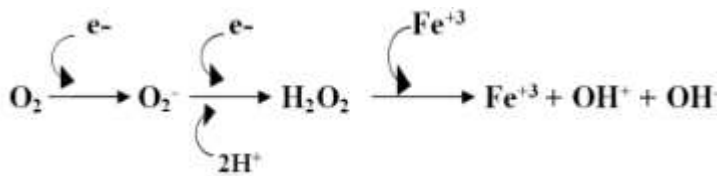


Figura 1. Reações químicas que resultam na formação das espécies reativas de oxigênio. Modificado de Ferreira e Matsubara (1997)

### 4.4. Superóxido ( $O_2^-$ )

A formação do ânion superóxido ( $O_2^-$ ), acontece pela adição de um elétron à molécula de oxigênio ( $O_2$ ), sua formação ocorre espontaneamente em quase todas as células aeróbicas, especialmente na membrana mitocondrial, por meio da cadeia respiratória (Nordberg e Árner, 2001), tendo como principal característica pouca reatividade biológica e desenvolve sua ação somente no local onde são produzidos, sem interagir com membranas lipídicas.

#### 4.5. Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

O peróxido de hidrogênio é formado pela ação da enzima superóxido dismutase, que transforma o radical O<sub>2</sub><sup>-</sup> em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o qual não é um radical livre, mas um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa como intermediário na reação que produz o OH<sup>·</sup>. Tem vida longa e é capaz de atravessar membranas biológicas (Nordberg e Árner, 2001; Maia, 2006).

#### 4.6. Hidroxila (OH<sup>·</sup>)

É a espécie reativa de oxigênio que mais causa danos, por ser considerado o radical livre mais reativo do sistema biológico. Sua formação ocorre a partir do peróxido de hidrogênio, em uma reação catalisada por íons metais (Fe<sup>++</sup> ou Cu<sup>++</sup>), denominada reação de Fenton (Nordberg e Árner, 2001). Este radical hidroxila também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares (lipoperoxidação).

#### 4.7. Glutationa (GSH)

Encontrada em quase todas as células dos mamíferos, a glutatona (GSH) é um tri-peptídeo (γ-glutamina-cisteína-glicina) não proteico. Sua formação ocorre a partir de aminoácidos glutamato, cisteína e glicina, que são aminoácidos não essenciais e podem ser sintetizados no organismo, ou obtidos através da dieta. Devido a presença de um grupo tiol e um glutamato, se torna resistente a degradação por peptidases (Kim *et al.*, 1999)

Seu poder redutor é utilizado para manter os grupos tiol nas proteínas intracelulares e em outras moléculas. Atua como reservatório fisiológico da cisteína e está envolvido na regulação da síntese protéica, destoxificação celular e síntese de leucotrienos (Barreiros *et al.*, 2002). De acordo com as inúmeras atividades biológicas, em especial a atividade antioxidante, a glutatona está diretamente relacionada ao potencial de desenvolvimento oocitário e embrionário tanto *in vivo* como *in vitro* (Luberda, 2005).

Estudos apontam que os níveis de glutatona sofrem aumentos ao longo da maturação, visto que, oócitos que se encontram em metáfase II podem apresentar duas vezes a quantidade de GSH em relação a vesícula germinativa. Síntese essa regulada por gonadotrofinas (Zuelke *et al.*, 2003).

Devido à grande presença de espécie reativa de oxigênio durante o início do desenvolvimento embrionário, a glutatona diminui de quantidade rapidamente, e retoma sua síntese apenas com a ativação do genoma embrionário inicial, determinando a competência oocitária (Stradioli *et al.*, 2007). Glutaciona atua também, além da ação antioxidante, na descondensação do material genético espermático, formação do pronúcleo masculino e manutenção do potencial redox (Abeydeera *et al.*, 1998).

O processo de maturação *in vitro* acarreta em produção de grandes quantidades de espécie reativa de oxigênio devido a grande pressão do O<sub>2</sub>, interferência da luz e presença de espermatozoides, conseqüentemente, a mobilização de glutaciona se intensifica, suscetibilizando ao estresse oxidativo (Livingston *et al.*, 2009)

Baseado nos fatos descritos, e com o intuito de diminuição de efeitos citotóxicos decorrente da produção de espécie reativa de oxigênio, melhorando assim os resultados da produção *in vitro* de embriões bovinos, propõe-se a suplementação dos meios de cultivo oocitário e embrionário com moléculas antioxidantes (Urdaneta *et al.*, 2004), e a redução dos níveis de oxigênio à níveis mais próximos do fisiológico (5%) (Kitagawa, *et al.*, 2004)

#### **4.8. Antioxidantes**

Uma molécula antioxidante pode ser definida como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas àquela do substrato oxidável, previne ou retarda, a oxidação daquele substrato. E tem a capacidade de transformar espécie reativa de oxigênio em água (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Naturalmente, na tuba uterina, o fluido folicular é rico em antioxidantes, diferindo consideravelmente, quando passamos para o cultivo *in vitro*, que além de dispor de poucas quantidades de antioxidantes, tem elevadas concentrações de espécie reativa de oxigênio, fazendo-se necessário então a adição de antioxidantes nos meios de cultura (Silva *et al.*, 2010). Existem dois sistemas de defesa antioxidantes: os antioxidantes enzimáticos e os não enzimáticos.

O sistema enzimático é conhecido por antioxidantes naturais que garantem uma proteção intrínseca ao sistema biológico contra os danos oxidativos (Ribeiro, 2005) . Por meio de uma cooperação sinérgica das enzimas superóxido dismutase, catalase, peroxirredoxinas, glutaciona redutase, glutaciona peroxidase e NADPH-quinona oxidoreductase, os organismos mantêm a concentração de espécie reativa de oxigênio dentro dos limites fisiológicos (Andrade *et al.*, 2010). O não enzimático, por sua vez, é conhecido por antioxidantes

sintéticos ou suplementos da dieta. A proteção antioxidante desse sistema é realizada por moléculas que protegem os alvos biológicos contra o processo oxidativo. Para tal, essas moléculas devem apresentar pelo menos uma das três propriedades: (i) inibir a formação de radicais livres (quelar íons metais ou suprimir enzimas geradoras de radicais livres), (ii) eliminar ou inativar radicais livres, formando um produto estável, ou (iii) participar do processo de reparo (Ribeiro, 2005). Esse grupo é composto por várias substâncias, tais como ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), selênio, zinco, taurinas, hipotaurinas, glutathiona, betacaroteno, caroteno, cistina, flavonoides, L-cisteína, clorofilina entre outras tantas (Bianchi e Antunes 1999).

#### **4.9. Quercetina**

A quercetina é um antioxidante da classe dos flavonoides, que possuem várias propriedades farmacológicas, que podem ser: anti-inflamatória, anticarcinogênica, cardiovascular e antioxidante (Kang *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013). A atividade antioxidante dos flavonoides depende da propriedade redox de seus grupos hidroxifenólicos. Dentre os flavonoides, a quercetina é a que melhor atende aos requisitos químicos para a função antioxidante (Behling *et al.*, 2008).

Segundo Braun e colaboradores (2011) a quercetina vem recebendo maior atenção quanto aos seus benefícios, pois apresenta até cinco vezes mais capacidade de combater espécie reativa de oxigênio em comparação ao ácido ascórbico e o tocoferol. A ação antioxidante da quercetina ocorre pela interação direta desta molécula com o radical superóxido, o peróxido de hidrogênio, e por quelar íons metálicos (Kang *et al.*, 2013; Behling, 2004). Diminuir a formação de espécie reativa de oxigênio é fundamental para minimizar os danos ao DNA e a apoptose celular causada pelo estresse oxidativo (Scotti, *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2010).

#### **4.10. Cisteamina**

A cisteamina é o resultado da degradação do aminoácido cisteína, que tem a função, no sistema biológico, de clivar ligações dissulfeto. Desse modo, a sua relação com a síntese de glutathiona reduzida durante a produção *in vitro* de embriões bovinos, ela vem sendo estudada por alguns pesquisadores (De Matos *et al.*, 2002). A síntese de glutathiona depende da

disponibilidade de cisteína presente nos meios de cultura. Entretanto, a molécula de cisteína, quando em ambiente extracelular, é instável, sendo auto-oxidada à cistina. O potencial da cisteamina em quebrar ligações dissulfeto reduz a cistina à cisteína, proporcionando, assim, maior disponibilidade de cisteína no meio de produção *in vitro* de embriões e, conseqüentemente, o aumento na síntese de glutathione, o qual melhora a taxa de desenvolvimento dos blastocistos *in vitro* (Córdova, 2010).

#### **4.11. Carnitina**

A L-carnitina é um nutriente sintetizado a partir de um aminoácido essencial, a lisina, estando presente em todas as mitocôndrias do corpo. Estudos recentes demonstraram que o uso da L-carnitina durante o desenvolvimento *in vitro* e a maturação oocitária aumenta o desenvolvimento embrionário e a massa celular interna (Dunning *et al.*, 2011), tem atividade antioxidante que pode proteger as membranas mitocondriais e o DNA contra o dano induzido por espécie reativa de oxigênio, aumenta também a concentração de glutathione (Wu *et al.*, 2011; Samfai *et al.*, 2011), e inibe fortemente a apoptose mitocondrial (Pillich *et al.*, 2005). A L-carnitina pode atuar também potencializando o metabolismo lipídico, através do seu papel primordial, no transporte de ácidos graxos a partir do citoplasma, para dentro da mitocôndria (Ye *et al.*, 2010).

#### **4.12. Vitamina C**

Vitamina C (ácido ascórbico) é uma vitamina hidrossolúvel, considerada o mais importante antioxidante do fluido extracelular (Hosseini *et al.*, 2007; Alvarez *et al.*, 2006). Sua ação abrange a diminuição de espécie reativa de oxigênio até a prevenção de formação de hidroperóxido de lipídeos nas lipoproteínas plasmáticas, levando a proteção celular dos danos oxidativos (Annae e Creppy, 2001; Nordberg e Árner, 2001).

Tem como uma das principais funções a secreção hormonal, síntese de colágeno e antioxidação (Thomas *et al.*, 2001; Monteiro *et al.*, 2005).

### 4.13. Resveratrol

Resveratrol é uma fitoalexina de ocorrência natural, produzido pelo metabólito vegetal, principalmente na uva, é derivado de uma interação de plantas com um microorganismo encontrado nas raízes das plantas (Langcake *et al.*, 1979; Gusman *et al.*, 2001). O resveratrol exerce várias atividades biológicas, incluindo efeito anti-inflamatório, anti-proliferativo, cardioprotetor, anticancerígeno e antioxidante (Pervaiz e Holme, 2009; Lee, *et al.*, 2010).

## 5. Material e métodos

Os produtos utilizados nos experimentos e suas respectivas referências estão descritos em anexo.

### 5.1. Coleta e seleção dos oócitos

No período de março a dezembro de 2013 os ovários de fêmeas bovinas foram coletados em frigoríficos da região de Londrina, Paraná para realização dos experimentos.

No decorrer do abate os ovários foram acondicionados em uma garrafa térmica de 2 litros com solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) a aproximadamente 25° C de temperatura. Ao chegar ao laboratório, os ovários foram lavados por três vezes em NaCl 0,9% estéril e os folículos ovarianos com diâmetro de 2 – 8 mm foram aspirados com auxílio de uma agulha (1,20 X 40 mm) conectada a uma seringa descartável de 10 mL. O líquido proveniente dos folículos foi depositado em tubos plástico cônicos de 50 mL e mantido em repouso para decantação por 10 minutos. O *pellet* foi transferido para uma placa de *Petri* (100 x 15 mm), acrescido de 5 mL de meio para cultivo celular (TCM-199) e sob estereomicroscópio foi feita a seleção dos oócitos. Somente oócitos classificados como graus I e II (De Loos *et al.*, 1991), contendo três ou mais camadas de células do *cumulus oophorus* e citoplasma uniforme, foram utilizados para os experimentos.

## 5.2. Diluição e estoques das substancias antioxidantes

Tabela 1: As substancias foram aliquotadas em microtubos e estocadas a - 20°C.

Antioxidantes	Concentrações	Diluentes	Nome comercial
Quercetina	50 mg/mL	Hidróxido de sódio 1M	Sigma Q4951
Cisteamina	100 mg/mL	Água ultrapura	Sigma C8397
Carnitina	50 mg/mL	Água ultrapura	Sigma C0158
Vitamina-C	10 mg/mL	Água ultrapura	Sigma A4403
Resveratrol	50 mg/mL	Álcool etílico PA	Sigma R5010

## 5.3. Maturação *In vitro*

Os oócitos dos folículos de 2–8 mm de diâmetros foram selecionados, classificados e divididos em seis grupos: controle (sem antioxidantes), quercetina (2  $\mu$ M), cisteamina (100  $\mu$ M), carnitina (0.5 mg/mL), vitamina-C (50  $\mu$ g/mL) e reverastrol (2  $\mu$ M).

A maturação foi feita em meio de maturação que consiste em meio de cultivo de tecidos, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 5,0  $\mu$ g/mL de hormônio luteinizante, 0,5 $\mu$ g/mL de hormônio foliculo estimulante, 0,2  $\mu$ M de piruvato e 50  $\mu$ g/mL de gentamicina. Os oócitos foram cultivados separadamente na presença dos diferentes antioxidantes: quercetina, cisteamina, carnitina, vitamina-C, resveratrol e na ausência dos antioxidantes (controle) durante 22 horas, em gotas de 100  $\mu$ L de meio de maturação sob óleo mineral, montadas em placa de Petri, a 38,5°C e atmosfera de 5% de gás carbonico. Cada gota continha aproximadamente 20 oócitos.

## 5.4. Fertilização *In vitro*

### 5.4.1. Preparação do Sêmen

O sêmen congelado de um único touro de origem zebuina (*Bos taurus indicus*) da raça Nelore, com palhetas de uma mesma partida e de fertilidade conhecida, proveniente da central Lagoa da Serra.

A metodologia usada para separação dos espermatozóides foi através do método de gradiente de Percoll (Parrish *et al.*, 1988). Em um tubo de microcentrífuga, foram adicionados 400  $\mu$ L de Percoll 90% e sob este 400  $\mu$ L de Percoll 45% formando um gradiente. O sêmen

foi descongelado em banho-maria em uma temperatura de 37°C por um período de 30 segundos. Em seguida o sêmen foi depositado sobre a coluna superior do gradiente de Percoll (gradiente 45% superior e 90% inferior), e submetido a centrifugação (800 G por 5 minutos). Após a centrifugação foi desprezado o sobrenadante e com auxílio de uma pipeta, o *pellet* contendo os espermatozói-de foi diluído com 1 mL de meio de fertilização *in vitro* (Parrish *et al.*, 1988) e centrifugado novamente (200G por 2 minutos) para remoção do excedente de Percoll. O *pellet* foi usado fecundação dos oócitos a uma concentração final de  $2 \times 10^6$  espermatozoides/mL.

#### 5.4.2. Meio de fecundação

A realização da fecundação *in vitro* foi em meio tyrodes, albumina, lactato e piruvato (Parrish *et al.*, 1988), com 2  $\mu$ M de penicilamina, 1  $\mu$ M de hipotaurina, 250  $\mu$ M de epinefrina, 20  $\mu$ g/mL de heparina e 6 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA).

Os oócitos foram maturados (Item 5.3.) e após este período foram transferidos para o meio de fecundação. Os oócitos juntamente com os espermatozói-des ( $2 \times 10^6$  espermatozoides/mL) foram coincubados em gotas de 100  $\mu$ L de meio de fecundação *in vitro* sob óleo mineral, montadas em placa de Petri, por um período de 18 horas, a 38,5°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 5.5. Cultivo *In vitro*

Após a fecundação *in vitro* (18 horas) os oócitos foram transferidos para o meio de cultivo *in vitro*. O cultivo *in vitro* foi realizado com Fluido Sintético do Oviduto (Holm *et al.*, 1999), contendo aminoácidos essenciais (BME) e não essenciais (MEM), 0,34 mM de citrato trissódico, 2,77 mM de mioinositol, 3% de Soro fetal bovino, 4 mg/mL de albumina sérica bovina, 0,75 mg/mL de glicina, 0,15 mg/mL de alanina e 0,09 mg/mL de glutamina em monocamada de células somáticas (Guemra *et al.*, 2013) e mantidos por oito dias em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> e temperatura de 38° C

No segundo dia de cultivo foi avaliada a taxa de clivagem, no sétimo dia foi avaliada a taxa de blastocistos e no oitavo dia a taxa de eclosão dos embriões. Os embriões eclodidos foram fixados para contagem do número de células (Item 5.7.).

Toda a produção dos embriões foi feita placa de *Petri* em gotas de 100  $\mu$ l de meio ( $\pm 20$  oócitos por gota), sob óleo mineral a 38,5°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar.



## 5.6. Níveis de glutatona e espécies reativas de oxigênio

Os oócitos foram maturados (Item 5.3.), desnudados (remoção da células do *cumulus*) em Tampão fosfato-salino-Álcool polivinil e os níveis intracelular de espécies reativas de oxigênio nos oócitos foram mensurados por ensaio de fluorescência utilizando 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetato (DCFDA), segundo (Das *et al.*, 2013). Os oócitos foram incubados na ausência de luz em meio Tampão fosfato-salino contendo 0,1% de álcool polivinílico (PVA) e 10  $\mu$ M de DCFDA, durante 15 minutos a 30°C. Após incubados os oócitos foram lavados três vezes em tampão fosfato-salino-álcool polivinil e transferidos para gotas de 10  $\mu$ L do mesmo tampão, sobre uma lâmina de vidro e expostos por 5 segundos em luz ultravioleta (UV) e a emissão de fluorescência foi captada pela câmera Infinity do microscópio Eclipse Ti Nikon, equipado com o filtro G-2 E/C. As imagens (fluorescência) registradas foram analisadas usando-se o programa Adobe Photoshop CS6.

Os oócitos foram maturados (Item 5.3.), desnudados (remoção da células do *cumulus*) em Tampão fosfato-salino-Álcool polivinil e os níveis glutatona foram determinados com marcador de fluorescência Cell Tracker Blue (4-clorometil-6, 8 - difluoro-7- hidroxycumarina, CMF2HC). Os oócitos foram incubados na ausência de luz em meio tampão fosfato-salino contendo 0,1% de álcool polivinil e 10  $\mu$ M de Cell Tracker Blue, durante 15 minutos a 30°C (Guemra *et al.*, 2013). Após a incubação oócitos foram lavados três vezes em tampão fosfato-salino-álcool polivinil e transferidos para gotas de 10  $\mu$ L do mesmo tampão, sobre uma lâmina de vidro e exposto por 5 segundos em luz UV e a emissão de fluorescência foi captada pela câmera Infinity do microscópio Eclipse Ti Nikon, equipado com o filtro UV-2A. As imagens (fluorescência) registradas foram analisadas usando-se o programa Adobe Photoshop CS6.

Os níveis de espécies reativas de oxigênio e glutatona foram relacionados com as intensidades de fluorescência registradas nas imagens. As fotografias foram obtidas com o uso do programa Infinity V6.2.0 e as fluorescência avaliadas pelo programa Adobe Photoshop CS6. A escala ou intensidade de fluorescência analisada pelo programa Adobe Photoshop CS6 esta dentro de uma escala que varia de 0 a  $2.55 \times 10^2$  de fluorescência.

### 5.7. Número de células

Para contagem do número de células dos blastocistos eclodidos, (embriões com 8 dias de cultivo) os embriões foram fixados em 3,7% de paraformaldeído em tampão fosfato-salino - álcool polivinil por 30 minutos; lavados três vezes em PBS- álcool polivinil; corados com 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Hoechst 33342 em tampão fosfato-salino - álcool polivinil por 10 minutos; lavados três vezes em tampão fosfato-salino - álcool polivinil e montados entre lâmina e lamínula para a avaliação sob microscópio de epifluorescência. A emissão de fluorescência foi captada pela câmera Infinity do microscópio Eclipse Ti Nikon, equipado com o filtro UV-2A. As imagens registradas foram salvas e posteriormente era feita a contagem das células, através do programa Infinity V6.2.0.

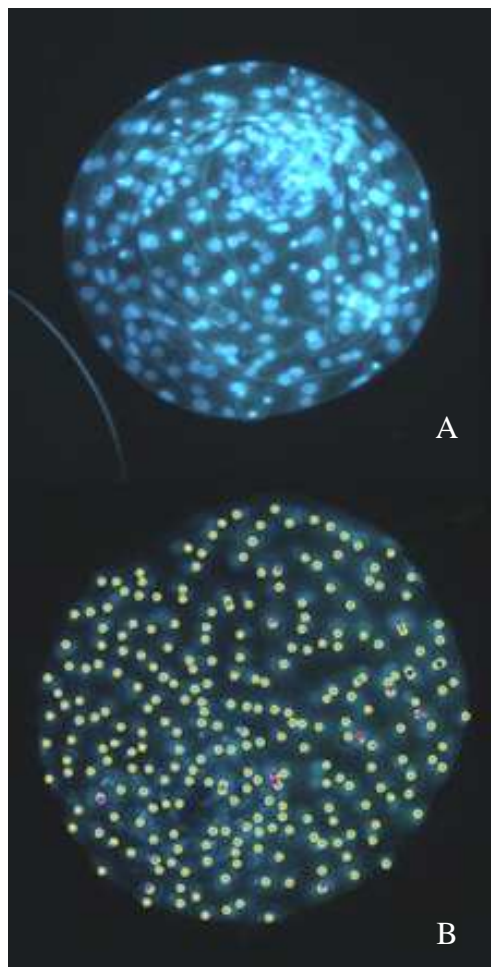


Figura 2: Embrião corado com Hoechst 33342, para contagem de células, (A) Embrião corado, (B) embrião com todas as células marcadas - contagem de células embrionárias ou blastómeros.

## 5.8. Análise estatística

As variáveis (percentual de embriões) foram transformadas, de acordo a função arco seno (raiz - percentagens), de acordo com as recomendações de Banzato e Kronca (1989) e avaliados utilizando o programa BioEstats 4.0 (Ayres *et al.*, 2007), após foi aplicado ANOVA à 5% de significância para evidenciar diferenças entre os tratamentos.

Os dados do número de células dos blastocistos e estimativa de fluorescência nos oócitos corados para espécie reativa de oxigênio e glutathiona não foram transformados, sendo analisados em escala original. Para os resultados significativos nas análises de variância, foi utilizado o pós teste de *Bonferroni* como procedimento de comparações múltiplas entre os grupos.

## 6. Resultados

Para a avaliação dos antioxidantes na produção *in vitro* de embriões, os oócitos foram submetidos a maturação, a fecundação e ao cultivo *in vitro*. Os resultados do desenvolvimento embrionário *in vitro* estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Uso de diferentes antioxidantes na produção *in vitro* de embriões.

Tratamentos	Oócitos	Clivagem D3	Blastocisto D7	Eclosão D8	Células D8
	Nº	Nº (% $\pm$ dpm)	Nº (% $\pm$ dpm)	Nº (% $\pm$ dpm)	Nº (Min-Max $\pm$ dpm)
Controle	142	126 (88.7 $\pm$ 4.4)	74 (52.1 $\pm$ 7.9)	47 (63.5 $\pm$ 18.3)	126 (96-202 $\pm$ 23.1) <sub>a</sub>
Quercetina	143	123 (86.0 $\pm$ 4.5)	77 (53.8 $\pm$ 6.5)	43 (55.8 $\pm$ 16.7)	131 (96-234 $\pm$ 38.3) <sub>a</sub>
Cisteamina	142	124 (87.3 $\pm$ 5.3)	73 (51.4 $\pm$ 6.3)	39 (53.4 $\pm$ 10.9)	159 (105-253 $\pm$ 41.7) <sub>b</sub>
Carnitina	144	120 (83.3 $\pm$ 8.3)	78 (54.2 $\pm$ 11)	53 (67.9 $\pm$ 14.2)	148 (97-282 $\pm$ 38.7) <sub>b</sub>
Vitamina C	137	120 (87.6 $\pm$ 6.9)	70 (51.1 $\pm$ 7.3)	47 (67.1 $\pm$ 22.3)	157(104-237 $\pm$ 36.5) <sub>b</sub>
Resveratrol	137	125 (91.2 $\pm$ 3.1)	74 (54.0 $\pm$ 9.3)	41 (55.4 $\pm$ 10.6)	148 (101-259 $\pm$ 45.6) <sub>b</sub>

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença ( $P < 0,05$ ) entre tratamentos. Desvio padrão médio (dpm) de três repetições. Número mínimo e máximo (Min-Máx) de células dos embriões eclodidos.

D2 dois dias pós-fecundação *in vitro*; D7 sete dias pós-fecundação *in vitro*; D8 oito dias pós-fecundação *in vitro*.

Para a avaliação da ação dos antioxidantes sobre as espécies reativas de oxigênio e glutathiona foram usados 355 oócitos maturados *in vitro* em três repetições. A mensuração

relativa de espécie reativa de oxigênio estão apresentados na Figura 3 e a mensuração relativa de glutatona na Figura 5.

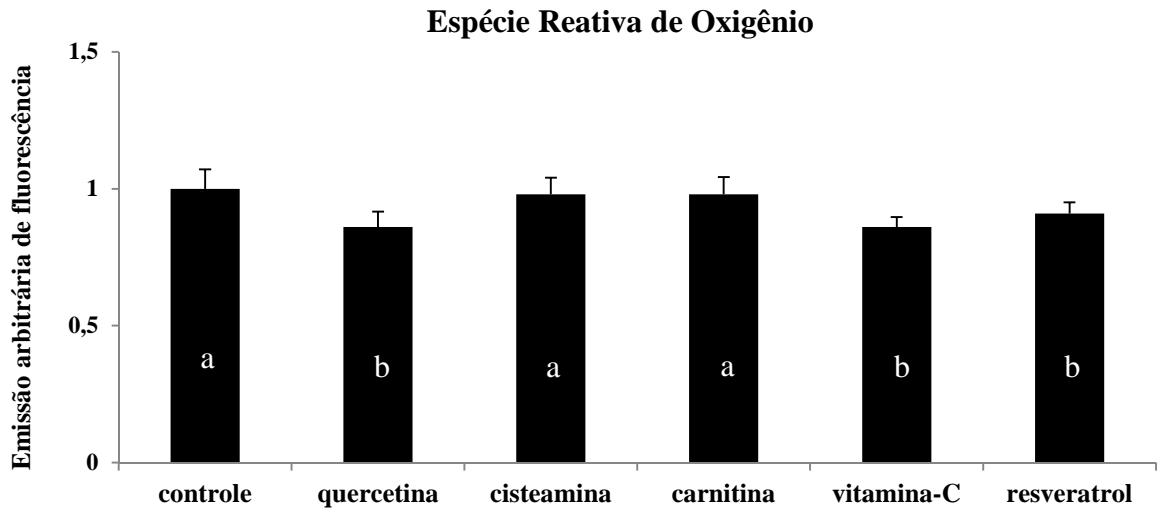


Figura 3. Níveis de espécie reativa de oxigênio em oócitos bovinos maturados com diferentes antioxidantes.

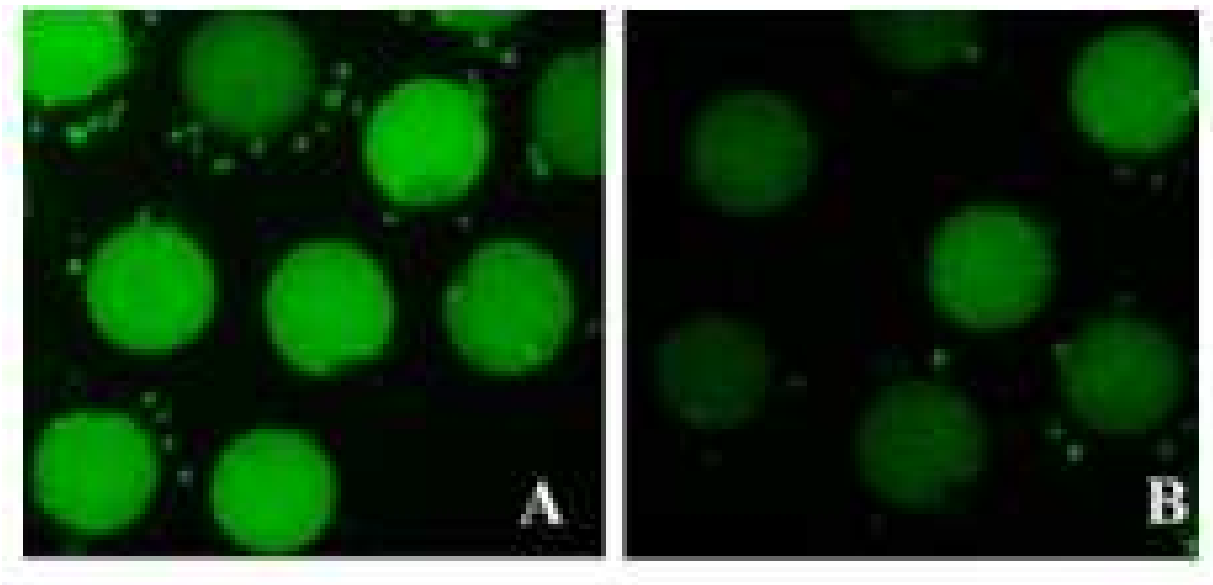


Figura 4: imagem ilustrativa dos oócitos corados com  $H_2DCFDA$  para avaliação dos níveis de espécie reativa de oxigênio intracelular. A figura A tem altos níveis de espécie reativa de oxigênio intracelular e a figura B tem baixos níveis de espécie reativa de oxigênio.

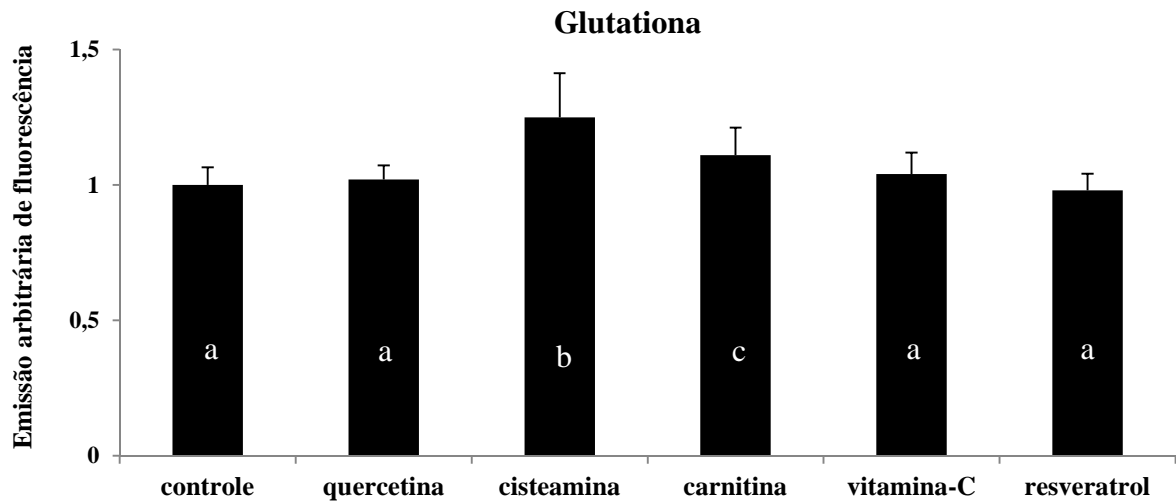


Figura 5: Níveis de glutathiona em oócitos bovinos maturados com diferentes antioxidantes.

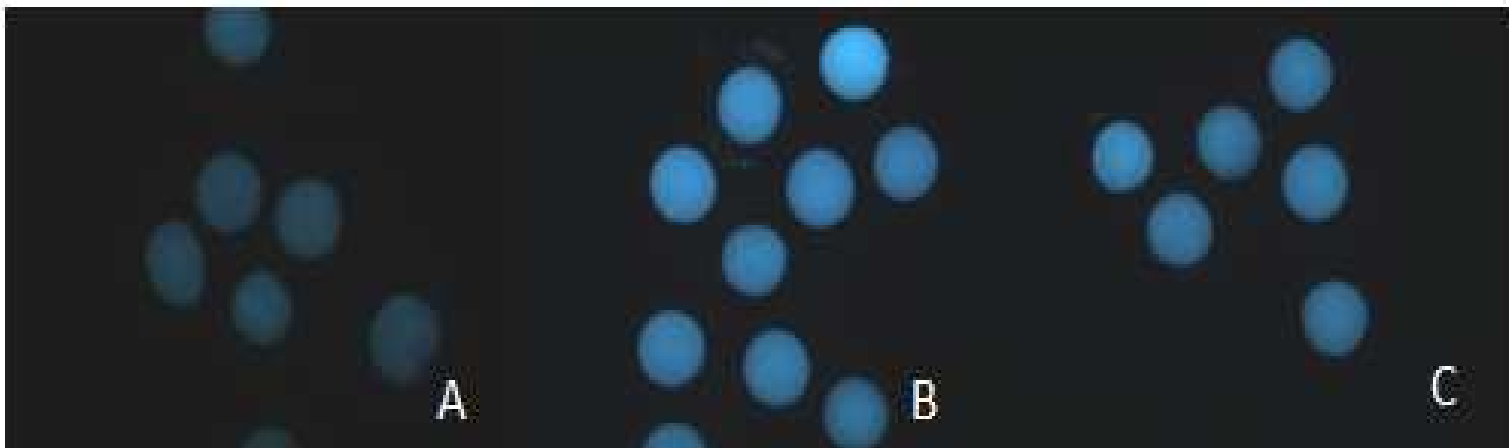


Figura 6: Imagem ilustrativa dos oócitos corados com Cell tracker blue.

## 7. Discussão

Em condições fisiológicas, antioxidantes e espécie reativa de oxigênio, encontram-se em equilíbrio, porém quando se perde esse equilíbrio, aumenta consideravelmente a quantidade de espécie reativa de oxigênio e ocorre o estresse oxidativo (Andrade *et al.*, 2010). Em consequência ao estresse oxidativo, ocorre a produção de radicais livres, que em grandes quantidades causam danos irreparáveis às células, podendo levar a perda de suas funções (Yang *et al* 1998; Silva *et al.*, 2011).

Nas condições do presente estudo, foram testadas diferentes substâncias antioxidantes, visando uma diminuição dos radicais livres e consequente melhora na produção de embriões: porém o uso dos antioxidantes (quercetina, cisteamina, carnitina, vitamina-C e resveratrol) não obtiveram diferenças significativas na produção *in vitro* de embriões em comparação com o meio controle, tanto na clivagem quanto na produção de blastocistos; sugerindo assim que não seria necessária a adição de antioxidantes no meio de maturação. Porém o meio controle é munido de alguns antioxidantes, e, a literatura descreve como imprescindível o uso de antioxidantes na maturação citoplasmática, o que confere um posterior desenvolvimento até estágio de blastocisto (Furnus *et al.*, 2008; Silva, *et al.*, 2011).

A taxa de eclosão de blastocisto no 8º dia de cultivo, não apresentou diferença estatística ente os grupos tratados com antioxidante e o grupo controle, porém as taxas obtidas no presente estudo foram superiores as citadas na literatura (Schneider, *et al.*, 1998)

O número de células é um dos parâmetros mais utilizados para caracterizar a qualidade de embriões produzidos *in vitro*. A adição de antioxidantes exerce uma influência positiva sobre o desenvolvimento embrionário de bovinos, aumentando o número de células (Van Soom *et al.*, 2002). Fato que foi confirmado no presente experimento, pois apresentou aumento significativo do número de células nos diferentes tratamentos com antioxidantes em relação ao grupo controle, com exceção da quercetina que não apresentou diferença significativa ( $P > 0,05$ ) em relação ao grupo controle.

É importante haver equilíbrio entre a quantidade de espécie reativa de oxigênio e a quantidade de antioxidantes, pois as espécies reativas de oxigênio quando em concentrações adequadas, desempenham importantes funções fisiológicas reprodutivas, como na maturação oocitária, na esteroidogênese ovariana, na ovulação, na implantação, na formação de blastocisto, na manutenção do corpo lúteo, na gestação e na luteólise (Sabatini *et al.*, 1999; Behrman *et al.*, 2001). Em condições especiais, como é o caso da produção *in vitro* de embriões, onde todo o processo é realizado “artificialmente” *in vitro*, a produção de espécie reativa de oxigênio acaba se elevando, o que é prejudicial ao processo. Por isso a eleição de adição de antioxidantes é o método para controle das perdas na produção.

No presente estudo os níveis de espécie reativa de oxigênio diferiram significativamente entre o grupo controle (sem adição de antioxidante) e alguns grupos tratados com antioxidantes: O grupo da quercetina, vitamina-C e resveratrol reduziram significativamente ( $P < 0,05$ ) o níveis de espécie reativa de oxigênio, resultado também encontrado por Braun *et al.*, (2011) e confirmado por Guemra *et al.*, (2013) onde também afirmam que a quercetina é capaz de reduzir as espécie reativa de oxigênio. Em estudo,

Kwaka *et al.*, (2012) também observaram que o uso do resveratrol tem importante papel na diminuição de espécie reativa de oxigênio e conseqüentemente, melhora na produção de embriões.

Em relação a glutathione, pode-se notar que apresentaram aumentos dos níveis de glutathione intracelular apenas quando adicionado cisteamina e carnitina ao meio de maturação. Atribui-se esse aumento ao fato de que esses antioxidantes são precursores de glutathione (Wu *et al.*, 2011), e contribuem também no equilíbrio da espécie reativa de oxigênio (De Matos *et al.*, 2002). Pois a cisteamina é um componente Thiol encontrado naturalmente no ovário da fêmea (Guyader-Joly *et al.*, 1998) e sua função é proteger as células neutralizando as espécies reativas de oxigênio através da estimulação da síntese de glutathione (Guérin *et al.*, 2001). Assim como, a carnitina que tem atividade antioxidante que pode proteger as membranas mitocondriais e o DNA contra danos causados por espécie reativa de oxigênio (Gülçin, 2006) agindo fortemente na síntese da glutathione (Pillich, *et al.*, 2005). Já os demais antioxidantes (quercetina, vitamina-C e resveratrol) não apresentaram diferenças estatísticas em comparação ao meio controle, pois atuam no combate direto as espécie reativa de oxigênio e não são precursores de glutathione.

## 8. CONCLUSÃO

A partir deste estudo, pode-se concluir que a suplementação do meio de maturação *in vitro* com antioxidantes melhora a qualidade dos embriões, quando comparados o número total de células, mas não nas taxas de eclosão. Também não foi possível afirmar uma melhora na quantidade de produção de embriões no que diz respeito as taxas de clivagem e blastocisto, o que talvez, sugere um estudo mais detalhado. Os antioxidantes quercetina (0,86), vitamina-C (0,86) e resveratrol (0,91) foram capazes de diminuir os níveis de espécie reativa de oxigênio em relação ao grupo controle (1). Os antioxidantes que tiveram bons resultados no aumento intracelular dos níveis de glutathione foram a cisteamina (1,25) e a carnitina (1,11), em relação ao grupo controle (1), comprovando sua ação precursora da síntese de glutathione.

Contudo, novos estudos serão necessários para compreender melhor o comportamento dos antioxidantes durante a produção *in vitro* de embriões.



## 9. REFERÊNCIAS

- ABEYDEERA L.R; WANG W.H; CANTLEY T.C; PRATHER R.S; DAY B.N. Presence of bmercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured in vitro and the rate of blastocyst development after in vitro fertilization. *Theriogenology*. v.50, p.47-56, 1998.
- ADONA, P. R.; LEAL, C. L. V. Meiotic inhibition with different cyclin-dependent kinase inhibitors in bovine oocytes and its effects on maturation and embryo development. *Zygote*, v. 12, n. 3, p. 197-204, 2004.
- AGARWAL A; GUPTA S; SHARMA R.K. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproduction Biology Endocrinol*. v.3, p.1-21, 2005.
- AGARWAL A; GUPTA S; SEKHON L; SHAH R. Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxidant Redox Signal*. v.11, p.375-403, 2008.
- ALVAREZ C.A; MORAES G.V; SCAPINELLO C; MARTINS E.N; CARDOZO R.M.; MATAVELI M; KIOSHIMA R.S. Efeito da suplementação de selenometionina e vitamina C sobre a morfopatologia espermática do sêmen de coelho. *Acta Science Animal Science*, v.28, p.165-175, 2006.
- ANDRADE, E.; 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.
- ANNAE R; CREPPY E.E. Lipid peroxidation as pathway of aluminium cytotoxicity in human skin fibroblast cultures: prevention by superoxide dismutase + catalase and vitamin E and C. *Human Experimental Toxicology*, v.20, p.477-481, 2001.
- ASSUMPCÃO, M. E.; HAIPECK, O. D.; LIMA, K. A. Capacitação espermática in vitro com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. *Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science*, vol.39, n.3, p.149-156, 2002.

AYRES M.; AYRES J.R.M.; AYRES D.L. & SANTOS A.S. BioEstat 5.0-Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas: Sociedade Civil Mamirauá, Belém. CNPq, Brasília. P.290, 2007.

BANZATO, D.A.; KRONKA, S.N. Experimentação agrícola. Jaboticabal: Funep, p. 247, 1989.

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

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. Química Nova, v. 29, p. 113-123, 2002.

BEHLING, E. B. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. Alimentos e Nutrição Araraquara, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BEHLING, E.B.; SENDÃO, M.C.; FRANCESCATO, H.D.C.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. Alimentos e Nutrição Araraquara, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2008.

BEHRMAN, H. R; P. H. KODAMAN, S. L. PRESTON. Oxidative stress and the ovary. Journal of the Society for Gynecologic Investigation, v. 8, n. 1 supplementation, p. S40-S42, 2001.

BIANCHI, M. D. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. Revista de Nutrição, v. 12, n. 2, p. 123-30, 1999.

BRAUN, K. F.; EHNERT, S.; FREUDE, T.; EGANA, J.T.; SCHLENCK, T.L.; Quercetin protects primary human osteoblasts exposed to cigarette smoke through activation of the antioxidative enzymes HO-1 and SOD-1. The Scientific World Journal, v. 11, p. 2348-2357, 2011.

BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; MORIN, N.; BRISSON, C.; CARBONEAU, G.; DUROCHER, J. In vitro embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. *Theriogenology*, v. 51, p. 59-70, 1999.

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, n. 1, p. 37- 49, 2010.

CÓRDOVA, B. Effect of the addition of insulin-transferrin-selenium and/or L-ascorbic acid to the in vitro maturation of prepubertal bovine 57 oocytes on cytoplasmic maturation and embryo development. *Theriogenology*, v. 74, n. 8, p. 1341-1348, 2010.

DAS, Z. C.; GUPTA, M.K.; UHM, S.J.; LEE,H.T. Supplementation of insulin–transferrin–selenium to embryo culture medium improves the in vitro development of pig embryos. *Zygote*, p. 1-8, 2013.

DE LOOS, F.; VAN VLIET, C.; VAN MAURIK, P.; KRUIP.P.; KRUIP, T.A. Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Research*, v.24, p.197-204, 1991.

DE MATOS, D.G.; GASPARRINI, B; PASQUALINI, S.R. 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.

DUNNING, K.R.; AKISON, L.K.; RUSSEL, D.L.; NORMAN, R.J.; ROBKER, R.L. Increased beta-oxidation and improved oocyte developmental competence in response to L-carnitine during ovarian in vitro follicle development in mice. *Biology Reproduction*. v.85, p. 548-555. 2011.

FERREIRA A.L.A; MATSUBARA L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*. v.43, p.1-16, 1997.

FURNUS, C.; DE MATOS, D.G.; PICCO, S. Metabolic requirements associated with GSH synthesis during in vitro maturation of cattle oocytes. *Animal Reproduction Science*, v.109, p.88-99, 2008.

GARCIA, J.; AVELINO, K.; VANTINI, R. Estado da arte da fertilização in Vitro em bovinos. *Annals of the First International Symposium on Animal Reproduction*, p.223-230, 2004.

GATE L.; PAUL J.; BA G.N.; TEW K.D, TAPIERO H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomedical Pharmacother*. V.53, p.169-80, 1999.

GILCHRIST, R.B. Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to in vitro maturation. *Reproduction Fertility Development*. v. 23 p.23– 31, 2011.

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; Effects of 56 cumulus cells and cysteamine during bovine oocyte in vitro maturation on meiosis progression and acquisition of developmental competence. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 64, n. 2, p. 245-252, 2012.

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

GUEMRA, S.; MONZANI, P.S.; SANTOS, E.S.; ZANIN, R.; OHASHI, O.M.; MIRANDA, M.S.; ADONA, P.R. 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, p. 1616-1624, 2013.

GUÉRIN, E.L; 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, p.175-89, 2001.

- Gülçin I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Science*. v.78, p.803, 2006.
- GUSMAN J; MALONNE H; ATASSI G. A reappraisal of the potential chemopreventive and hemotherapeutic properties of resveratrol. *Carcinogenesis*. v.22, p.1111, 2001.
- GUYADER-JOLY C.; GUÉRIN P.; RENARD J. P. Precursors of taurine in female genital tract of mammals: effect on gametes and embryo. *Amino Acids*, v.15, p. 27-42, 1998.
- HAFEZ, E. Foliculogênese, maturação ovocitária e ovulação. HAFEZ, ESE; HAFEZ, B. *Reprodução Animal*. 7ª 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.
- HANSEN K.H.; BRACKEN A.P.; PASINI D. A model for transmission of the H3K27me3 epigenetic mark. *Nature Cell Biology*, v.10, p.1291-1300, 2006.
- HARDY, K.; WRIGHT, C.S.; FRANKS, S.; WINSTON, R.M.L. In vitro maturation of oocytes. *British medical bulletin*, v. 56, n. 3, p. 588-602, 2000.
- HOLM, P.; BOOTH, P.J.; SCHMIDT, M.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, p.683-700, 1999.
- HOSHI, H. In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. *Theriogenology*, v.59, p.675-685, 2003.
- 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  $\alpha$ -tocopherol and l ascorbic acid on in vitro fertilized porcine embryo development. *Animal Reproduction Science*, v.100, p.107-117, 2007.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores IBGE 2013. Pesquisa Pecuária. Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 17 fevereiro 2015.

KANG, J. T.; KWON, D. K.; PARK, S. J.; KIM, S. J.; MOON, J. H.; KOO, O. J; JANG, G.; LEE, B. C. Quercetin improves the in vitro development of porcine oocytes by decreasing reactive oxygen species levels. *Journal of Veterinary Science*, v. 14, n. 1, p. 15-20, 2013.

KIM, I.H.; VAN LANGENDONCKT, A.; VAN SOOM, A.; VANROOSE, G.; CASI, A.L.; HENDRIKSEN, P.J.M.; BEVERS, M.M. Effect of exogenous glutathione on the in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, v. 52, p.537-547, 1999.

KITAGAWA Y.; SUZUKI K.; YONEDA A. Watanabe T. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology*. v. 62, p.1186-97, 2004.

KWAKA, S.S.; CHEONGA, S.A.; JEONA, Y.; LEEB, E.; CHOIC, K.C.; JEUNGC, E.B.; HYUNA, S.H. The effects of resveratrol on porcine oocyte in vitro maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and in vitro fertilization. *Theriogenology*. 2012.

LANGCAKE P; CORNFORD C; PRYCE R. Identification of pterostilbene as a phytoalexin from *Vitis vinifera* leaves. *Phytochemistry*. v.7, p.504-510. 1979.

LEE K; WANG C; CHAILLE J.M; MACHATY Z. Effect of resveratrol on the development of porcine embryos produced in vitro. *Journal Reproduction Development*, v. 5, p.56-330, 2010.

LI, Y.; DENG, Y.; TANG, Y.; YU, H. GAO, C.; LIU, L.; YAO, P. Quercetin protects rat hepatocytes from oxidative damage induced by ethanol and iron by maintaining intercellular liable iron pool. *Human & Experimental Toxicology*, 2013.

LIVINGSTON T; RICH K; MACKENZIE S; GODKIN J.D. Glutathione Content And Antioxidant Enzyme Expression Of In Vivo Matured Sheep Oocytes. *Animal Reproduction Science*. v.73, p.116-265, 2009.

LIU, S.; HOU, W.; YAO, P.; ZHANG, B.; SUN S; NUSSLER, A.K.; LIU, L. Quercetin protects against ethanol-induced oxidative damage in rat primary hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, v. 24, n. 2, p. 516-522, 2010.

LONERGAN, P.; GUTIERREZ-ADAN, A.;PINTADO, B., FAIR, T.; WARD, F.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M. Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-I growth factor, its receptor, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts produced in vitro. *Molecular reproduction and development*, v. 57, n. 2, p. 146-152, 2000.

Luberda Z. The role of glutathione in mammalian gametes. *Reproduction Biology*. v.5, p.5-17, 2005.

MAIA M.S. Viabilidade espermática e geração de metabólitos Reativos do Oxigênio (ROS) no semen ovino criopreservado em diluidor aditivado de Lauril Sulfato de Sódio (OEP), Trolox-C e Catalase. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.

MERTON, J.S.; DE ROOS, A.P.W.; MULLAART, E.; DE RUIGH, L.; KAAL, L.; VOS, P.L.A.M.; DIELEMAN, S.J. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, v. 59, n. 2, p. 651-674, 2003.

MEINECKE, B.; JANAS, U.; PODHAJSKY, E.; MEINECKE-TILLMANN, S. Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 36, n. 3-4, p. 183-188, 2001.

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.

NAGAI, T. The improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology*, v.55, p.1291-1301, 2001.

NORDBERG J.; ÁRNER E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology Medical*, v.31, p.1287-1312, 2001.

PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.; WINER, M.A.; FIRST, N.L. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology Reproduction*, v.38, p.1171-1180. 1988.

PERVAIZ S.; HOLME A.L. Resveratrol: its biologic targets and functional activity. *Antioxid Redox Signal*. v.11, p.2851-97, 2009.

PILLICH R.T.; SCARSELLA G.; RISULEO G. Reduction of apoptosis through the mitochondrial pathway by the administration of acetyl-L-carnitine to mouse fibroblasts in culture. *Experimental Cell Research*. v.306, p.1- 8, 2005.

RIBEIRO, S. M. R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Bioscience Journal*, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

SABATINI, L.; WILSON, C.; LOWER, A. Superoxide dismutase activity in human follicular fluid after controlled ovarian hyperstimulation in women undergoing in vitro fertilization. *Fertilization Steril.*, v.72, p.1027-1034, 1999.

SAMFAI, T.; KANEDA, M.; AKAGI, S.; WATANABE, S.; HARAGUCHI, S. Enhancement of lipid metabolism with L-carnitine during in vitro maturation improves nuclear maturation and cleavage ability of follicular porcine oocytes. *Reproduction , Fertility and Development*, v.29, p. 912-920. 2011.

SANGILD, P.T.; SCHMIDT, M.; JACOBSEN, H. Blood chemistry, nutrient metabolism, and organ weights in fetal and newborn calves derived from in vitro produced bovine embryos. *Biological Reproduction*, v.62, p.1495-1504, 2000.

SCHNEIDER, M. R.; HOLME, A.L.; NETTO, C.A.; DIELEMAN, S.J. Short-term storage of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology*, v. 49, p. 249, 1998.

SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; CARDOSO, C.; PAULETTI, P.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; VELASCO, M. V. R.; MENEZES, C. M. S.; FERREIRA, E. Modelagem



molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 43, n. 2, p. 3-12, 2007.

SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; SARAIVA, M. V. A; ROSSETTO, R.; FIGUEIREDO, J.R. Influência da tensão de oxigênio na maturação oocitária e cultivo in vitro de folículos e embriões. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 34, p. 233-242, 2010.

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

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

STROUD B. IETS 2011 Statistics and Data Retrieval Committee Report: The year 2010 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. *Embryo Transfer Newsletter*, v.29, p. 14–23, 2007.

THOMAS F.H.; LEASK R.; V. 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.

URDANETA A; JIMÉNEZ A.R; PARAMIO M; IZQUIERDO D. Cysteamine, glutathione and ionomycin treatments improve in vitro fertilization of prepubertal goat oocytes. *Zygote*. v.12, p.277-84, 2004.

VAN SOOM, A.; YUAN, Y.Q.; PEELMAN, L.J.; DE MATOS, D.G.; DEWULF, J.; LAEVENS, H.; DE KRUIF, A. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with ou without cysteine addition. *Theriogenology*, v. 57, p. 1453-1465, 2002.

WU, G.Q; B-Y; ITA, J.J; X.-W, F.U.; G-B, Z.H.; HOU, S.E. L-carnitine enhances oocyte maturation and development of parthenogenetic embryos in pigs. *Theriogenology*. v.76, p.785-793. 2011.

YANG, X.; KUBOTA, C.; SUZUKI,H. Control of oocyte maturation in cows—biological factors. *Theriogenology*, v. 49, n. 2, p. 471-482, 1998.

YE, J.; LI, J.; YU, Y.;WEI, Q.; DENG, W. L-carnitine attenuates oxidant injury in HK-2 cells via ROS-mitochondria pathway. *Regulatory Peptides*. v. 161, p.58-66. 2010.

ZUELKE K.A; JEFFAY S.C; ZUCKER R.M; PERREAULT S.D. Glutathione (GSH) concentration vary with the cell cycle in maturing hamster oocytes, zygotes, and preimplantation stage embryos. *Molecular Reproduction Development*. v.64, p.106-12, 2003.

## 10. Anexos - Protocolos de meios para produção *in vitro* de embriões bovinos

<b>ESTOQUES – MIV, FIV e CIV</b>		
<b>9) Solução Salina</b>		
H <sub>2</sub> O		<b>50,0 mL</b>
NaCl (0,9%)		0,45 g
<b>6) Piruvato (0,4 mM)</b>		
H <sub>2</sub> O		<b>1,0 mL</b>
Piruvato (1000X)	Sigma/P-5280	0,044 g
Filtrar/estocar no freezer (validade seis meses)		
<b>8) Ácido Lático 30%</b>		
H <sub>2</sub> O		5,0 mL
Ácido Lático 60%	Sigma – L7900	5,0 mL
Estocar na geladeira por um mês		
<b>10) Hipotaurina (1 mM)</b>		
NaCl 0,9%		<b>10,0 mL</b>
Hipotaurina	Sigma/H-1384	0,0011 g
Filtrar e fazer alíquotas		
<b>11) Citrato de Sódio tri básico</b>		
H <sub>2</sub> O		<b>1,0 mL</b>
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> .2H <sub>2</sub> O		0,01 g
Filtrar/estocar na geladeira		
<b>11) Epinefrina (250 mM) Proteger da luz</b>		
H <sub>2</sub> O		<b>40,0 mL</b>
Acido láctico (60%)		104 µL
Metabissulfito (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	Sigma/S-9000	0,04 g
<b>Corrigir o pH para 4,0 com HCl (1M)</b>		
Acrescentar a Epinefrina	Sigma/E-1635	0,00183 g
Filtrar e fazer alíquotas		
<b>12) Penicilamina (2 mM)</b>		
NaCl 0,9 %		<b>10,0 mL</b>
Penicilamina	Sigma/P-4875	0,003 g
Filtrar e fazer alíquotas		
<b>13) PHE (Proteger da luz)</b>		
NaCl (0,9%)		8,0 mL
Penicilamina		5,0 mL
Hipotaurina		5,0 mL

Epinefrina		2,0 mL
Estocar em alíquotas de 250 µL no freezer por seis meses (proteger da luz).		
<b>14) Heparina</b>		
NaCl 0,9 %		10,0 mL
Heparina (3 mg/mL)	Sigma – H9399	0,03 g
Filtrar/estocar no freezer alíquotas de ± 30 µL (validade seis meses)		

<b>15) CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>		
H <sub>2</sub> O		5,0 mL
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O		0,155 g
Filtrar/estocar na geladeira (validade seis meses)		

<b>16) Aminoácidos (AA)</b>		
H <sub>2</sub> O		6,0 mL
Glicina (50X)	Sigma/G-8790	0,225 g
Alanina (50X)	Sigma/A-7627	0,045 g
Glutamina (50X)	Sigma/G-8540	0,027 g
Filtrar/estocar no freezer (validade seis meses)		

<b>17) Myo-inositol (2,7 mM)</b>		
H <sub>2</sub> O		1,0 mL
Myo-inositol	Sigma – I7508	0,05 g
Filtrar/estocar na geladeira		

<b>18) TALP – Fec. (estoque)</b>		
H <sub>2</sub> O (q.s.p.)		50,0 mL
NaCl	Sigma/S-9625	0,333 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma/S-5515	0,002 g
NaHCO <sub>3</sub>	Sigma/S-5461	0,105 g
KCl	Sigma/P-5405	0,012 g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Sigma/M-2393	0,005 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	Sigma/C-7902	0,015 g
Acido láctico (30%)	Sigma/L-7900	144 µL
Phenol red	Sigma/P-3552	0,0005 g
Antibiótico		50 µL
pH: ± 7,8. Filtrar e estocar na geladeira por duas semanas. mOsm. ± 285 (TALP - Tyrode's Albumin lactate Pyruvate)		

<b>19) TALP – SP (10X) (estoque)</b>		
H <sub>2</sub> O (q.s.p.)		10,0 mL
NaCl		0,584 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		0,0035 g

KCl		0,0232 g
Acido láctico (30%)		620 µL
Hepes	Sigma/H-4034	0,238 g
NaHCO <sub>3</sub>		0,21 g
Phenol red		0,0001 g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O		0,008 g
Antibiótico		100 µL
<b>pH: ± 7,3.</b> Filtrar e estocar na geladeira por duas semanas. mOsm. ± 285		

20) SOF (estoque)		
H <sub>2</sub> O (q.s.p.)	50 mL	100 mL
NaCl	0,315 g	0,630 g
KCl	0,0266 g	0,0532 g
NaHCO <sub>3</sub>	0,11 g	0,22 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma/P-5655 0,0081 g	0,0162 g
MgSO <sub>4</sub>	Sigma/M-2643 0,0045 g	0,009 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,0131 g	0,0262 g
Acido láctico (30%)	62 µL	124 µL
Antibiótico	50 µL	100 µL
Filtrar/estocar na geladeira (validade uma semana)		

## II) MEIOS DE ROTINA (MIV, FIV e CIV)

21) Meio de maturação ("B")	
TCM-199	4,5 mL
Solução de LH/FSH	10 µL
Piruvato	5 µL
Antibiótico	5 µL
Soro (SFB)	500 µL
Estabilizar na estufa por ± 3 h antes de adicionar os ovócitos na gota (Gotas de 100µL ± 25 ovócitos).	
22) Meio de fecundação (FIV)	
TALP-Fec	4,5 mL

Piruvato		5,0 µL
Heparina		15,0 µL
PHE		200 µL
BSA	(Sigma/A-6003)	0,03 g
Estabilizar na estufa por ± 3 h antes de adicionar os ovócitos na gota (Gotas de 100µL ± 25 ovócitos).		
<b>23) Meio de cultivo (SOF)</b>		
<b>SOF estoque</b>	<b>9,0 mL</b>	<b>4,5 mL</b>
MEM (100X)	100 µL	50 µL
BME (50X)	200 µL	100 µL
AA (aminoácidos)	200 µL	100 µL
Piruvato	10 µL	5 µL
Myo-inositol	100 µL	50 µL
Citrato de Sódio tri básico	100 µL	50 µL
SFB (3%)	3000 µL	150 µL
BSA	0,04 g	0,02 g
Corrigir o pH: 7,2. (Validade uma semana)		
<b>24) Meio de manipulação (“H”)</b>		
TCM-199/Hepes	Sigma – M2520	4,9 mL <b>9,8 mL</b>
Piruvato		5,0 µL 10,0 µL
Antibiótico		5,0 µL 10,0 µL
SFB (2%)		100 µL 200 µL

### III) Preparação do Gradiente de percoll

<b>25) TALP-sp</b>		
H <sub>2</sub> O		<b>9,0 mL</b>
TALP – sp (10X)		1,0 mL
Piruvato		20,0 µL
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O		100,0 µL
BSA	Sigma/A9647	0,06 g
<b>26) Preparação do percoll 90% (uso e estoque)</b>		
Percoll comercial	Amersham B./17-0891-01	6,0 mL
TALP – sp (10X)		668,0 µL
<b>27) Preparação do percoll 60%</b>		
Percoll 90%		268,0 µL

TALP – sp	132,0 µL
<b>28) Preparação do percoll 45%</b>	
Percoll 90%	200 µL
TALP – sp	200 µL
<b>29) Preparação do gradiente de percoll</b>	
Percoll 45%	400 µL
Percoll 90% ou Percoll 60%	400 µL
Colocar o percoll 45% em um tubo e, em seguida adicionar no fundo tubo o percoll 90% - Estabilizar por uma hora.	

### 29) Preparação do sêmen pela técnica do percoll

- Descongelar o sêmen 37°C por 30 segundos;
- Adicionar lentamente o sêmen na parte superior do gradiente;
- Centrifugar a 650 G por 10-12 minutos;
- Retirar o sobrenadante com cuidado e adicionar 4 mL de TALP-sp sobre o pellet;
- Centrifugar novamente a 150 G por 1-2 minutos;
- Retirar o sobrenadante, fazer a concentração e a fecundação.

### 30) Cálculo para concentração de espermatozóides (spz)

- Prepara um micro tubo com 190 µL de água;
- Retira-se uma amostra de 10 µL Spz para concentração;
- Homogeneizar bem;
- Fazer a contagem de Spz na câmara de Neubauer;
- Contar 5 quadrante de cada lado da câmara;
- Somar o nº de Spz contados nos dois lados da câmara e fazer a média;
- Fazer os cálculos -  $CI \cdot VI = CF \cdot VF$ ;
- CI = concentração inicial – nº de Spz contado na câmara (média ex. ~46);
- VI = volume inicial –?;
- CF = concentração/final Spz/mL utilizado na fecundação ( $2,0 \cdot 10^6$  Spz/mL);
- VF = volume final – volume da gota de FIV (Ex. Gota de 100 µL);
- Fazer os cálculos para saber o volume há ser utilizado na FIV;
- Exemplo.  $VI = \frac{CF \cdot VF}{CI} \Rightarrow VI = \frac{2,0 \cdot 10^6 \cdot 100}{46}$

CI  $\sim 46.10^6$

- VI =  $\sim 4,3\mu\text{L}$  → Volume de Spz utilizado para inseminação dos ovócitos.

#### IV) Meios para coloração

##### 31) Solução de PBS

pH - 7.4 – filtrar/estocar na geladeira (validade dois meses)		Volume
H <sub>2</sub> O (q.s.p.)		500 mL
NaCl		4.0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	Nuclear/3168 (Obs: Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> = 0,575g)	1,08 g
D-glicose	Sigma/G-7021	0.5 g
KCl		0.1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		0.1 g
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O		0.05 g
Piruvato de sódio		0.018 g
Estreptomicina		0.025 g
Penicilina		0.029 g
Vermelho fenol		0.002 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O		0.066 g

##### 32) Solução Bloqueio (SB)

		Volume
PBS		100 mL
BSA		0,1 g
Glicina		0,751 g
Azida sódica	Sigma/S-8032	0,2 g

##### 33) Coloração dos Grânulos corticais

- 1- Desnudar os ovócitos em PBS + 1% de SFB (vortex 4 min);
- 2- Remoção da zona pelúcida: PBS + 0,5% de protease ( $\pm 8$  min);
- 3- Fixação: PBS + 3% de paraformaldeído (PFD) (30 min)(Sigma/P6148);
- 4- Incubação: SB (2h);



- 5- Permeabilização: SB + 0,1% de Triton X-100 (5 min)(USB/9002-93-1);
- 6- Coloração: SB com 1 µg/mL de *lens culinaris* (Sigma/L9262) + 10 µg/mL de Iodeto de propídio (15 min) (Sigma/P4170);
- 7- Lavar os ovócitos 3 vezes em SB;
- 8- Montagem das lâminas com glicerol (USB/CAS.56-81-5);
- 9- Visualização em microscópio de epifluorescência.

“*lens culinaris*” aglutinina conjugada a FITC (esta lecitina se liga especificamente à  $\alpha$ -D-manose presente nos grânulos corticais).

#### 34) Coloração do Citoesqueleto (microtúbulos)

- 1- Solução PP: PBS + 0,1% de PVA;
- 2- Desnudar os ovócitos em PBS + 1% de SFB (vortex 4 min);
- 3- Fixação: PBS com 3% de PFD + 0.6% de Triton X-100 (30 min);
- 4- Bloqueio: PP com 3% de Soro de Cabra (45 min);
- 5- Coloração: PP com  $\alpha$ -Tubulina conjugada com FITC (1:100)(1h);
- 6- Coloração: PP com 10 µg/mL de Iodeto de propídio (15min);
- 7- Lavar os ovócitos 3 vezes em PP;
- 8- Montagem das lâminas em glicerol;
- 9- Visualização em microscópio de epifluorescência.

#### 35) Coloração do Citoesqueleto (microfilamentos)

- 1- Solução PP: PBS + 0,1% de PVA;
- 2- Desnudar os ovócitos em PBS + 1% de SFB (vortex 4 min);
- 3- Fixação: PBS com 3% de PFD + 0.6% de Triton X-100 (30 min);
- 4- Coloração: PP + 1 µg/mL de Faloidina conjugada com FITC + 10 µg/mL de Iodeto de propídio (30 min);
- 5- Lavar os ovócitos 3 vezes em PP;
- 6- Montagem das lâminas em glicerol;
- 7- Visualização em microscópio de epifluorescência.

### 36) Coloração das Mitocôndrias

- 1- Desnudar os ovócitos em PBS + 1% de SFB (vortex 4 min);
- 2- Coloração: TCM-199/hepes + 10% de SFB com 0,5  $\mu$ M de Mitotracker red + 10  $\mu$ g/mL de hoechst (20 min);
- 3- Lavar os ovócitos 3 vezes em TCM-199/hepes + 2% de SFB;
- 4- Montagem das lâminas;
- 5- Visualização em microscópio de epifluorescência.

### 37) Recomendações gerais

- Usar produtos de marcas de confiança (Sigma e Gibco etc.);
- Usar Substâncias “embryo tested” preferencialmente;
- Usar água testada para PIV de embriões;
- Filtrar sempre;
- Deixar os meios de MIV, FIV e CIV estabilizando em overnight;
- Reduzir um pouco incidência de luz na sala de trabalho;
- As manipulações devem ser as mais rápidas possíveis;
- Se possível não usar material de vidro ou plástico reciclado;
- Cuidado com oscilações de temperatura durante os procedimentos, se necessário usar placa aquecedora;
- Atenção com o pH dos meios – pH entre 7,2 e 7,4;
- Ajustar a osmolaridade – mOsm entre 280 – 290.

Para corrigir o pH usar 1M HCl ou 1M NaOH

Para corrigir a osmolaridade usar NaCl ( $\uparrow$  mOsm) ou H<sub>2</sub>O ( $\downarrow$  mOsm)

**Créditos: Prof. Dr. Paulo Roberto Adona**