



**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – CEUB**  
**PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DA INSULINA TRANSFERRINA  
SELÊNIO (ITS) NA PRODUÇÃO E QUALIDADE DE EMBRIÕES  
BOVINOS**

**DANIELLE BARBARA PEREIRA DE CASTRO**  
**HALLYA BEATRIZ SOUSA AMARAL**

**BRASÍLIA**

**2022**



DANIELLE BARBARA PEREIRA DE CASTRO

HALLYA BEATRIZ SOUSA AMARAL

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DA INSULINA TRANSFERRINA  
SELÊNIO (ITS) NA PRODUÇÃO E QUALIDADE DE EMBRIÕES  
BOVINOS**

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica apresentado à assessoria de Pós-Graduação e Pesquisa. Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Brasília – CEUB.

Orientação: Prof. Dr. Andrei Antonioni Guedes Fidelis.

Coorientação: Dra. Margot Alves Nunes Dode.

**BRASÍLIA  
2022**

## **AGRADECIMENTOS**

Aos nossos pais por terem nos dado a oportunidade de estudar e pela compreensão em todos os momentos que não pudemos estar presentes por estarmos correndo atrás dos nossos estudos e carreira.

Ao nosso orientador, Andrei Fidelis, nosso mentor, inspiração, chefe, amigo e pai de profissão. Por todo conhecimento que nos proporcionou, pelas oportunidades, pela paciência em nos ensinar, por acreditar em nós e continuar persistindo na nossa formação como profissionais qualificados.

À nossa Coorientadora, Dra. Margot Dode e a Ligiane Leme, por todo ensinamento dentro da Embrapa que possibilitou a realização desse projeto, por toda ajuda durante esses meses, pela paciência em ensinar e compreensão.

E uma a outra, pelo apoio, ajuda e companheirismo nesses meses.

## RESUMO

Visto que o Brasil é um importante país no desenvolvimento da produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos, a eficiência dessa biotécnica ainda possui algumas limitações como por exemplo, o estresse oxidativo gerado pela produção exacerba de radicais livres. Os radicais livres são produzidos naturalmente pelo metabolismo, mas quando em altas concentrações geram danos ao sistema biológico, podendo causar apoptose e lipoperoxidação lipídica, conseqüentemente influenciando nas baixas taxas de produção de embriões e diminuindo a qualidade embrionária. Portanto, torna-se necessário buscar alternativas para minimizar os problemas causados pelo estresse oxidativo, como por exemplo o uso de antioxidantes eficientes, estáveis, seguros e não tóxicos para a suplementação dos meios utilizados para produção de embriões. Tendo em vista nisso foi testado o uso do ITS (insulina transferrina e selênio) como antioxidantes em ovócitos coletados de ovários oriundos de abatedouro através de quatro tratamentos: T1: -CIS -ITS; T2: +CIS -ITS; T3: +CIS +ITS; T4: -CIS +ITS do meio de maturação *in vitro*. Esses ovócitos foram submetidos ao restante das etapas de produção *in vitro* de embriões, fecundação e cultivo *in vitro*. No primeiro experimento foi visualizado as taxas de produção de embriões de cada tratamento. Já no segundo experimento foi aferido a qualidade dos embriões a partir da coloração diferencial realizada em cada embrião produzido. Sendo possível avaliar se a presença do ITS ou não interferiu na produção e qualidade dos embriões produzidos. Em ambos os experimentos a presença do ITS na maturação *in vitro* não influenciou de forma significativa a produção e qualidade embrionária ( $p > 0,05$ ). Portanto há uma necessidade de mais estudos para avaliar outras formas de suplementação com ITS e associações onde tal complexo pode ser funcional, seja em outras concentrações ou em vias de uso como no cultivo *in vitro*, ou associação de seu uso nas duas etapas, maturação e cultivo *in vitro*.

**Palavras-chave:** antioxidantes, radicais livres, estresse oxidativo.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	6
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	8
2.1. Produção in vitro de embriões .....	8
2.1.1. Obtenção de ovócitos.....	8
2.1.2. Maturação <i>in vitro</i> .....	9
2.1.3. Fecundação <i>in vitro</i> .....	9
2.1.4. Cultivo <i>in vitro</i> .....	10
2.2. Fatores que afetam a produção in vitro de embriões bovinos.....	11
2.2.1. Produção de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo .....	12
2.3. Fatores que minimizam o estresse oxidativo .....	13
2.3.1. Uso de antioxidantes na produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos .....	14
2.4. Insulina Transferrina Selênio (ITS) .....	15
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	17
3.1. Delineamento experimental .....	17
3.2. Obtenção de ovócitos.....	17
3.3. Rastreamento e seleção dos ovócitos.....	18
3.4. Maturação <i>in vitro</i> .....	18
3.5. Fecundação <i>in vitro</i> .....	19
3.6. Cultivo <i>in vitro</i> .....	20
3.7. Coloração diferencial .....	20
3.8. Análise estatística .....	21
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	22
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	24
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	25

## 1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos no Brasil é uma importante biotécnica tendo em vista que o nosso país é um dos maiores produtores de embriões bovinos no mundo. Essa biotécnica é uma das principais ferramentas como multiplicadora de indivíduos de alto potencial genético tendo em vista seus benefícios como, alto melhoramento genético, diminuição do intervalo de gerações, maior pressão genética e uma grande produção de embriões por vaca. Porém apesar de todos os avanços e estudos, a PIVE ainda possui muitas limitações como por exemplo a qualidade inferior que os embriões produzidos *in vitro* possuem quando comparados aos embriões produzidos *in vivo* (CHAVES et al., 2010; GOTTARDI et al., 2012).

A baixa qualidade embrionária tem como uma das causas o estresse oxidativo, um dos fatores que afetam de forma negativa a PIVE. O estresse oxidativo é gerado a partir da produção exacerbada de radicais livres, que são compostos produzidos naturalmente pelo metabolismo celular, mas que quando em grandes quantidades gera estresse causando danos ao DNA, lipoperoxidação lipídica e até a apoptose e necrose das células. O estresse oxidativo não só influencia na qualidade embrionária, mas também pode influenciar na produção de embriões diminuindo as taxas de produção de blastocistos (ANDRADE et al., 2010; LONERGAN et al., 2000; YANG et al., 1998).

Diante disso, é importante buscar alternativas para minimizar o estresse oxidativo, reduzindo as concentrações de espécies reativas de oxigênio (ERO's) nos meios biológicos, principalmente no meio de produção de embriões *in vitro*. Uma alternativa viável é o uso de antioxidantes como suplementação dos meios utilizados na PIVE (ANDRADE et al., 2010; DE MATOS et al., 2002).

A insulina transferrina selênio (ITS) é um complexo de substâncias que possuem ações individuais que possuem também ações antioxidantes para diferentes efeitos, entre eles, regular a produção de ERO's. A insulina possui ação moduladora para a síntese de ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos, além de regular algumas funções celulares (VEDELER et al., 1991).

A transferrina inicialmente atua como transportadora de ferro intracelular, além disso essa molécula possui funções antioxidantes, removendo íons metálicos do meio, impedindo a formação de radicais livres no meio. A transferrina também atua prevenindo e reparando os danos oxidativos sendo usado como estimulante de proliferação celular (EKBLUM, 1984; BARNES e SATO, 1980).

Já a ampla ação como antioxidante do Selênio atua reduzindo as concentrações de radicais livres no meio biológico, além de ser um componente importante da enzima glutathione peroxidase, um potente agente antioxidante enzimático (EBERT et al., 2006; GRONBAEK et al., 1995).

Após a visualização de todos os benefícios que o ITS pode trazer, esse composto seria uma possível alternativa para melhorar as condições do meio de MIV, gerando assim um aumento nas taxas de maturação nuclear, conseqüentemente aumentando as taxas de produção de embrião e a qualidade dos mesmos. Tendo em vista nisso, o objetivo do proposto trabalho foi avaliar o efeito da suplementação do ITS no meio de maturação *in vitro* quanto as taxas de produção *in vitro* de embriões e quanto a qualidade embrionária.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1. Produção *in vitro* de embriões

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos surge como uma biotécnica que visa elevar a propagação genética de uma fêmea bovina a partir do melhor proveito dos ovócitos que, ordinariamente no ciclo estral, seriam perdidos em consequência à atresia folicular (BARRETA et. al, 2021).

Nesse sentido, esses gametas são submetidos, *in vitro*, a condições que mimetizam o que ocorreria *in vivo* para se produzir embriões e, posteriormente, transferi-los a uma fêmea receptora. O processo da PIVE é dividido em quatro etapas: aspiração de ovários para obtenção de complexos cumulus-oócito (COC's); maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV); e cultivo *in vitro* (CIV) de zigotos e de embriões (BARRETA et. al, 2021; DODE et. al, 2010).

#### 2.1.1. Obtenção de ovócitos

De acordo com Dode et. al, 2010, os gametas femininos podem ser recuperados por aspiração de folículos ovarianos, bem como por fatiamento ou por dissecação de ovários, a se definir o procedimento de acordo com cada caso (BARRETA et. al, 2021).

Rotineiramente, a aspiração é a técnica de eleição, que pode ser feita, nos casos de aspiração em animal *in vivo*, por meio de cirurgia ou pelo uso da técnica de aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom (ovum pick up - OPU); ou pelo uso de agulha acoplada à bomba a vácuo ou a uma seringa, em que se aspira os folículos com diâmetro entre 2 e 8mm, nos casos de ovários oriundos de abatedouro (BARRETA et. al, 2021; DODE et. al, 2010; LAGARES, MENDONÇA E VARAGO, 2008).

No que tange aos ovários oriundos de abatedouro, estes são comumente transportados submersos em solução tamponada com fosfato ou em solução salina a 0,9% de NaCl, mantidos em temperatura de 35°C em média. Ademais, o prazo de transporte não deve passar de 8 horas a contar da obtenção dos ovários (BARRETA et. al, 2021; DODE et. al, 2010).

Após a aspiração e respeitado o período de decantação, o pellet formado é transferido para uma placa de Petri para que se realize a etapa de rastreamento e de seleção de ovócitos (DODE et. al, 2010).

### 2.1.2. Maturação *in vitro*

Uma vez que os ovócitos aspirados não sofreram sua adequada maturação e capacitação, eles precisam, para tanto, ser submetidos à etapa da MIV, na qual é comumente utilizado o TCM-199 (Tissue Culture Medium), meio base, suplementado com: sais de Earle, fonte proteica, antibióticos e hormônios, sendo que esse mesmo meio é adaptado de acordo com a prática de cada laboratório (BARRETA et. al, 2021; DODE et. al, 2010; LAGARES, MENDONÇA E VARAGO, 2008).

Quanto à fonte proteica, observa-se que o soro fetal bovino (SFB) e que a albumina sérica bovina (BSA) são as fontes mais utilizadas entre os laboratórios. Já em relação aos hormônios, em geral, são utilizados o hormônio luteinizante (LH) e/ou o hormônio folículo estimulante (FSH) – gonadotrofinas –, bem como o fator de crescimento epidermal (EGF) ou o hormônio do crescimento (GH) (BARRETA et. al, 2021; DODE et. al, 2010).

Selecionados os gametas femininos, estes são transferidos para gotas de meio MIV, submergidas em óleo mineral, e mantidos nesse meio em incubadora com atmosfera de 5% dióxido de carbono, umidade saturada e 39°C de temperatura por 22 a 24 horas (DODE et. al, 2010).

### 2.1.3. Fecundação *in vitro*

A fecundação se refere à fusão do material genético do espermatozoide e do ovócito, e a posterior formação de um indivíduo. Dentre os eventos que ocorrem nessa etapa, destacam-se a ligação do espermatozoide à zona pelúcida (ZP) do ovócito; a reação acrossomal e a penetração da ZP; a ativação do ovócito (fim da meiose); a expulsão do segundo corpúsculo polar; e a singamia (DODE et. al, 2010; LANDIM-ALVARENGA, 2017).

Para a FIV, é necessário que o ovócito tenha completado sua maturação (metáfase II), bem como que o espermatozoide tenha sofrido capacitação, e que estejam em meio que mimetize o ambiente do oviduto, onde ocorreria a fecundação *in vivo* (BARRETA et. al, 2021).

Nesse sentido, antes da fecundação, é necessário que o sêmen a ser utilizado seja adequadamente preparado. Geralmente, o swin-up – migração ascendente – e o Percoll – gradiente de densidade – são as técnicas mais aplicadas para se realizar a separação dos espermatozoides vivos dos demais componentes indesejados (crioprotetores e componentes do sêmen) (BARRETA et. al, 2021; DODE et. al, 2010).

De acordo com Dode et. al (2010), na técnica do swim-up, em um tubo com meio de preparação de sêmen, deposita-se o sêmen no fundo, o qual permanece em repouso por 60 minutos aproximadamente. Os gametas que estiverem vivos, por motilidade ascendente, migrarão para a parte superior do mencionado meio, porção essa que será utilizada na FIV, e o restante do conteúdo do sêmen permanecerá no fundo do tubo.

Quanto à técnica de gradiente de Percoll, Barreta et. al (2021) explanam que o Percoll é formado por elementos de sílica coloidal cobertas com polivinilpirrolidona (PVP), que, para criar os gradientes, pode ser feito em diversas concentrações.

Nessa técnica, o sêmen é centrifugado, o que permite a passagem pelos diferentes gradientes e a separação dos gametas vivos do conteúdo restante – princípio da sedimentação celular conforme o gradiente de densidade (BARRETA et. al, 2021; DODE et. al, 2010). Para a mencionada separação, normalmente se utiliza um tubo com duas concentrações, 45% e 90%, depositando-se o sêmen na superfície do gradiente, com posterior centrifugação. Uma vez centrifugado retira-se o sobrenadante e lava-se o pellet formado, para depois utilizar na FIV (DODE et. al, 2010).

Além de respeitar o período da MIV e de realizar a separação espermática, é necessário que se forneça um adequado ambiente para a capacitação espermática e, assim, para a fecundação. Para tanto, habitualmente utiliza-se o meio Fert-TALP, que, para se estimular a capacitação espermática, contém heparina, e, para estimular a atividade desses gametas, é adicionado penicilamina, hipotaurina e epinefrina (PHE) (BARRETA et. al, 2021).

Após a MIV, os ovócitos são transferidos para as gotas de fecundação e depois são co-cultivados (ovócitos e espermatozoides) por um prazo de 12 e 18 horas, em incubadora com atmosfera de 5% dióxido de carbono, umidade saturada e 39°C de temperatura (BARRETA et. al, 2021).

#### 2.1.4. Cultivo *in vitro*

Ocorrida a fecundação, os prováveis zigotos são transferidos para gotas com meio de cultivo, com a finalidade de suporte nutricional celular e, assim, de desenvolvimento embrionário, e assim permanecem por 7 dias, até o estágio de blastocisto, que podem ser transferidos para uma fêmea receptora para gestação a termo (BARRETA et. al, 2021; DODE et. al, 2010).

O TCM-199 é o meio usualmente utilizado no cultivo embrionário de bovinos. Utiliza-se também fluidos da tuba uterina (sintetic oviduct fluid - SOF) e do útero. Esse meio é

suplementado com fungicidas e antibióticos, bem como com fonte proteica, soro fetal bovino (SFB) ou albumina sérica bovina (BSA). Ademais, por ser tamponado com bicarbonato, o CIV é mantido em atmosfera a 5% de dióxido de carbono, 5% de oxigênio e 90% de nitrogênio (DODE et. al, 2010).

## 2.2. Fatores que afetam a produção *in vitro* de embriões bovinos

Ainda que se busque utilizar meios com características mais próximas do ambiente *in vivo*, a produção *in vitro* ainda não consegue se assemelhar de forma efetiva, fato este que reflete tanto nas taxas de desenvolvimento embrionário quanto nos aspectos moleculares e morfológicos dos embriões formados (CAMARGO et. al, 2006). Dentre os fatores que influenciam a PIVE, pode-se mencionar: fatores maternos, tamanho do folículo ovariano, estresse térmico, efeito da raça, fatores paternos, fatores relacionados ao ambiente *in vitro* e tensão de oxigênio (BARRETA et. al, 2021; CAMARGO et. al, 2006).

Em relação aos fatores maternos, destacam-se o tamanho do folículo aspirado, a competência do ovócito utilizado, a idade, a raça e o meio ambiente em que a vaca aspirada se encontra (BARRETA et. al, 2021; CAMARGO et. al, 2006).

Nesse sentido, a viabilidade do ovócito está relacionada ao tamanho e ao ambiente do folículo, dado que, no que o folículo cresce, o mencionado gameta cresce e se desenvolve junto, adquirindo competência para completar sua maturação meiótica e fazer reserva de RNAm para eventual fecundação (CAMARGO et. al, 2006). Segundo Dode et. al (2010), tratando-se de bovinos, folículos menores que 2mm de diâmetro frequentemente apresentam ovócitos que não alcançaram seu total crescimento e, assim, sem competência de maturação.

Estudos observaram variações entre as raças no que diz respeito ao desenvolvimento ovocitário e embrionário, o que pode ser justificado por fatores genéticos ou citoplasmáticos maternos (BARRETA et. al, 2021; CAMARGO et. al, 2006). Ainda em relação ao ovócito, Blair et. al (1998) observaram que, em ambientes mais quentes, vacas *Bos Taurus* apresentaram ovócitos com viabilidade inferior aos das vacas *Bos Indicus*, dado esse explicado pela maior capacidade de animais zebuínos se adaptarem à climas mais quentes.

Assim, Barreta et. al (2021), explicam que outros aspectos devem ser considerados além da raça da vaca aspirada, principalmente no que tange às condições em que esse animal se encontra, como, por exemplo, dieta fornecida, condições climáticas e manejo sanitário recebido, bem como os procedimentos laboratoriais realizados.

É necessário se atentar também com relação aos fatores paternos, já que alguns touros demonstram melhor taxa de conversão embrionária quando comparadas a outros, destacando-se, como um dos principais fatores, a capacidade do espermatozoide de realizar a fecundação (ASSUMPTÃO et. al, 2014). Ademais, a depender da qualidade do espermatozoide que realizar a fecundação, o embrião formado pode apresentar baixa qualidade (FERNANDÉZ-GONZALEZ, 2008).

### 2.2.1. Produção de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo

Como já mencionado anteriormente, o sistema *in vitro* ainda não é capaz de corresponder totalmente ao que ocorre no ambiente *in vivo*. Os embriões cultivados em laboratório são submetidos a uma atmosfera gasosa, a um pH e a um meio diferentes aos encontrados no trato reprodutivo feminino, o que afeta o seu desenvolvimento (ANDRADE et. al, 2016; HARVEY, 2007). Dentre os efeitos prejudiciais, pode-se mencionar o estresse oxidativo.

Dale et. al (2016) definem o estresse oxidativo como o desbalanço entre a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO's), também conhecidas pela sigla "ROS" – reactive oxygen species –, e sua eliminação pela ação de antioxidantes. Esses compostos são formados em razão do metabolismo celular e de reações enzimáticas no decorrer do desenvolvimento embrionário (DAY, HARDY E MORRIS, 2021).

Nesse sentido, essa formação é consequente das moléculas de oxigênio e do metabolismo aeróbico da célula, em que a mencionada molécula sofre redução, formando, pela associação de quatro elétrons, duas moléculas de água. Se esse processo de redução ocorrer de forma incompleta, havendo associação de menos elétrons, ocorrerá a constituição dos radicais livres, dentre eles: ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $OH^-$ ) (ACQUA et. al, 2022; DALE et. al, 2016).

Esses radicais livres são caracterizados pela sua instabilidade e sua alta reatividade, que conferem interações com diversas moléculas, como os ácidos nucleicos, os carboidratos e os lipídios, a fim de se adquirir elétrons e de se repor sua estabilidade. Apesar de serem importantes sinalizadores em algumas reações celulares, em excesso, geram oxidação de aminoácidos, peroxidação de lipídio, modificações no DNA mitocondrial e desordem na divisão meiótica, dentre outros danos celulares, que auxiliam ainda mais na formação de radicais livres (ACQUA et. al, 2022; BOMFIM. 2017; CROCOMO et. al, 2012; PARAMIO E SOTO-HERAS, 2020).

Na PIVE, a alta tensão de oxigênio, a composição do meio de cultura e a produção indireta de ERO's pelos espermatozoides são exemplos de fatores capazes de desencadear o estresse oxidativo em diversas fases do processo, que, por sua vez, pode acarretar atraso no desenvolvimento embrionário, alterações genéticas e epigenéticas do embrião e até mesmo apoptose, especialmente nas fases iniciais de zigoto e de clivagem (ACQUA et. al, 2022; ANDRADE et. al, 2016; BOMFIM. 2017; DAY, HARDY E MORRIS, 2021).

### 2.3. Fatores que minimizam o estresse oxidativo

Existem práticas na rotina do laboratório que podem minimizar a formação de ERO's na PIVE, como evitar exposição à luminosidade, manipulações dispensáveis e alta tensão de oxigênio. Além do mais, o uso de antioxidantes e de fatores de crescimento também são alternativas para esse fim (ACQUA et. al, 2022; DAY, HARDY E MORRIS, 2021; FRIGONI, 2016).

Baczkowski et. al (2004) observaram que os embriões expostos isoladamente ao estresse oxidativo apresentaram menor desenvolvimento embrionário (crescimento, formação e viabilidade celular de blastocistos), baixo número total de células embrionárias e da massa celular interna (MCI), bem como maior número de células que sofreram apoptose.

Os mesmos pesquisadores constataram que os embriões submetidos ao estresse oxidativo, mas com a presença de fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 ou tipo 2 (EGF-1 ou EGF-2), fator de células tronco (SCF) ou fator de crescimento epidérmico (EGF) no meio apresentaram desenvolvimento mais rápido e menor taxa de apoptose quando comparado ao grupo submetido apenas ao estresse oxidativo. Ademais, esses mesmos grupos tratados com IGF-1, IGF-2 e EGF apresentaram maiores números de células do blastocisto e da MCI, o que sugere sua ação positiva no desenvolvimento embrionário em circunstâncias não favoráveis como o estresse oxidativo.

Outros pesquisadores também verificaram a capacidade de o IGF-1 proteger o desenvolvimento embrionário do estresse oxidativo. Apesar de não bloquear a produção de radicais livres, observaram que esse fator protege os embriões dos efeitos deletérios gerados pelos ERO's, como a apoptose, bem como reduz a concentração intracelular de espécies reativas de oxigênio (FRIGONI, 2016; HANSEN, MOSS E PONTES, 2009).

Quanto à tensão de oxigênio, normalmente são utilizados o cultivo de alta tensão (20%) ou o de baixa tensão (5%), porém as incubadoras convencionais utilizadas para a MIV não

costumam controlar o gás atmosférico. O de alta tensão de oxigênio corresponde a até quatro vezes a mais da tensão de oxigênio fisiológico encontrado no oviduto, bem como no trato feminino no decorrer do desenvolvimento embrionário inicial, que tende a decair (BOMFIM, 2017; PARAMIO E SOTO-HERAS, 2020).

Nesse sentido, os ovócitos utilizados na MIV em um sistema de alta tensão são submetidos a um ambiente que acarreta elevados níveis de ERO's intracelular, que compromete a maturação ovocitária e a capacidade de sofrer fecundação (PARAMIO E SOTO-HERAS, 2020).

De acordo com Bermejo-Álvarez et. al (2010), o sistema de baixa tensão na MIV melhora de forma significativa a competência ovocitária, o que acarreta melhora na taxa de desenvolvimento embrionário. Por sua vez, Fernández-Santos et. al (2020) concluíram que a tensão relativa de oxigênio na MIV e na FIV, apesar de não influenciar na taxa embrionária até o estágio de blastocisto, influência nos padrões genéticos e, assim, na qualidade dos embriões formados.

Em relação ao CIV, Bomfim (2017) observou que a alta tensão de oxigênio desencadeia o estresse oxidativo, que, por sua vez, leva, além de outros danos, a alterações epigenéticas. Essa mesma pesquisa concluiu que os cultivos em alta tensão apresentam maiores níveis de ERO's quando comparados aos cultivos em baixa tensão, o que determina que a alta de oxigênio pode acarretar estresse celular e prejudicar o desenvolvimento do embrião.

### 2.3.1. Uso de antioxidantes na produção *in vitro* de embriões bovinos

Os antioxidantes são substâncias que, pela transformação de ERO's em água, equilibra, previne ou retarda a formação desses radicais livres de oxigênio quando em baixos níveis em relação ao substrato passível de oxidação (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999 apud SOVERNIGO, 2015).

Nesse sentido, há dois grupos de antioxidantes: os enzimáticos e os não enzimáticos (SIES, 1993). Os antioxidantes enzimáticos ou naturais são aqueles provenientes de enzimas antioxidantes produzidas pelos próprios organismos eucariontes e são divididos em três principais classes: superóxido dismutases, catalases e glutathione peroxidases (GPx). Os não enzimáticos são compostos por substâncias capazes de proteger contra o desenvolvimento oxidativo e são de origem sintética, suplementar dietética ou até mesmo do próprio organismo (COSTA et. al, 2005; SIES, 1997, SOVERNIGO, 2015).

Costa et. al (2005) explanam que os antioxidantes não enzimáticos precisam apresentar ao menos uma das seguintes capacidades: participação no procedimento de reparo; produzir um composto estável pela eliminação ou inativação de radicais livres; e/ou inibição de formação de espécies reativas de oxigênio. Zinco, taurinas, hipotaurinas, selênio, ácido ascórbico, tocoferol, cistina, caroteno, betacaroteno e glutathione são exemplos de antioxidantes não enzimáticos (ARAÚJO et. al, 2011; SOVERNIGO, 2015).

A fim de se equilibrar os níveis de espécies reativas de oxigênio, o próprio organismo do animal produz antioxidantes, e, por isso, o seu uso na PIVE tem ganhado cada vez mais espaço nas pesquisas, dado a probabilidade de ser uma ferramenta na redução do estresse oxidativo sofrido nos cultivos *in vitro* e, assim, na redução das injúrias sofridas pelo embrião (BOMFIM, 2017; SOVERNIGO, 2015).

Adona et. al (2017) explanam que a suplementação de antioxidantes auxilia no equilíbrio do sistema de cultivo *in vitro*, que, por sua vez, auxilia na maturação citoplasmática do ovócito e aumenta a taxa embrionária. Em seus experimentos, os mesmos pesquisadores observaram que os grupos suplementados com cisteamina, carnitina, vitamina C, quercetina ou resveratrol apresentaram maiores taxas de desenvolvimento embrionário quando comparados aos grupos sem tratamento.

Por fim, Paramio e Soto-Heras (2020) defendem que o uso de antioxidantes no meio de cultura da MIV é a principal escolha para se evitar o estresse oxidativo, sendo que cada laboratório deve fazer eleição do antioxidante com base nas condições individuais do próprio laboratório de ambiente, de recursos técnicos e de origem dos ovócitos.

#### 2.4. Insulina Transferrina Selênio (ITS)

Nesse sentido, o composto químico insulina-transferrina-selênio (ITS) tem sido objeto de pesquisa nas culturas de embriões *in vitro* pelas suas propriedades antioxidantes (BAO et. al, 2011; CÓRDOVA, 2010; DIÓGENES et. al, 2016; DODE et. al, 2020).

A insulina proporciona a captação de aminoácidos e de glicose; lipogênese; síntese e transporte intracelular de proteínas e de ácidos nucleicos. Além de ser uma transportadora de ferro, a transferrina auxilia no controle de ERO's, uma vez que colabora na redução de altos níveis de peróxido e de radicais de oxigênio. O selênio, por sua vez, realiza o papel de antioxidante no meio de cultura por ser um co-fator da glutathione peroxidase (DASGUPTA E MOKASHI, 2020).

Córdova et. al (2010) observaram melhora na maturação de ovócitos submetidos ao tratamento com ITS e ácido L-ascórbico (AA) nas primeiras 12 horas, bem como melhora no desenvolvimento embrionária. O grupo tratado apenas com ITS apresentou resultados próximos ao grupo controle.

Por outro lado, Diógenes et. al (2016) tiveram resultados positivos na capacitação ovocitária e na taxa embrionária quando os ovócitos foram tratados com ITS e AA nas 12 horas finais da maturação in vitro, mas não constataram diferença, quanto ao grupo controle, no tamanho e no número de células embrionárias em D7.

Enfim, a pesquisa de Dode et. al (2022) sugere que a suplementação dos meios de cultura com ITS é positiva no desenvolvimento embrionário em culturas individuais, bem como que o ácido fólico pode alterar, de forma positiva, metilação do DNA de gene relacionado com a qualidade embrionária.

### 3. MATERIAIS E METÓDOS

#### 3.1. Delineamento experimental

No proposto trabalho foram feitos quatro tratamentos do meio de maturação para testar a suplementação do ITS no meio de maturação como uma alternativa para aumentar as taxas de maturação ovocitária e conseqüentemente melhorar a produção e qualidade de embriões bovinos. O primeiro tratamento utilizado foi o meio de maturação padrão do laboratório de reprodução animal da Embrapa Cenargen sem nenhum antioxidante, como controle. O segundo foi o meio de maturação padrão do laboratório de reprodução animal da Embrapa Cenargen composto com cisteamina. O terceiro tratamento foi o meio de maturação padrão do laboratório de reprodução animal da Embrapa Cenargen com a presença de ITS. E quarto e último tratamento, meio de maturação padrão do laboratório de reprodução animal da Embrapa Cenargen sem a presença de cisteamina e com a presença de ITS.

Foram realizados dois experimentos para avaliar a presença do ITS na produção e qualidade de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Experimento 1: Avaliação da produção de embriões.

Nesse experimento foi visualizado as taxas de produção de embriões de cada tratamento. Podendo avaliar se o tratamento com a presença de ITS ou não influenciava na produção de blastocistos.

Experimento 2: Avaliação da qualidade dos embriões produzidos.

Nesse experimento foi aferido a qualidade dos embriões a partir da coloração diferencial realizada em cada embrião produzido. Sendo possível avaliar se a presença do ITS ou não interferiu na qualidade dos blastocistos produzidos.

#### 3.2. Obtenção de ovócitos

Os ovários usados para a obtenção dos ovócitos foram oriundos de um abatedouro de Anápolis – GO. Os ovários foram transportados durante a viagem em banho maria, temperatura de 35°C. Logo após a chegada dos mesmos ao laboratório, os ovários foram lavados com solução salina à 0,9% (NaCl, 0,9%), suplementado com antibióticos penicilina e estreptomicina, aquecida a 34-36°C e logo após a lavagem foram armazenados em um recipiente de vidro estéril, contendo essa mesma solução, onde permaneceram até o fim da

aspiração em banho maria nesta mesma temperatura. Todo o processo do transporte à aspiração e finalmente a colocação dos ovócitos puncionados em maturação foram feitos no intervalo de 4-6 horas.

### 3.3. Rastreamento e seleção dos ovócitos.

Após a aspiração, foi feito o rastreamento e seleção dos ovócitos. Aguardado 10 minutos para sedimentação dos ovócitos e formação do pellet no fundo do tubo, foi retirado com o auxílio de uma pipeta sorológica o líquido folicular ou sobrenadante e colocado em outro tubo. Esse líquido foi centrifugado à 37°C, a 700g por 5 minutos. Enquanto isso o pellet foi mantido em banho maria à 37°C. Em uma placa de Petri de 60mm foi colocado o pellet e cerca de 10mL do líquido folicular centrifugado para que os ovócitos fossem rastreados com o auxílio da lupa e manipulados com a pipeta de vidro e bulbo. Os ovócitos encontrados foram colocados em outra placa de Petri de 35mm contendo de 2-3mL de líquido folicular.

Após o rastreamento os ovócitos encontrados foram selecionados quanto à qualidade, avaliando a uniformidade do citoplasma e quantidade e aparência do complexos cumulus-oócito (COC's). Apenas ovócitos de grau 1 a 3 foram utilizados, ovócitos de grau 4 foram descartados. Após a seleção, os ovócitos foram agrupados em grupos de 25 a 30 por gota.

Antes de transferi-los para as gotas de maturação, foi dado um banho em cada grupo como o próprio meio de maturação de acordo com o tratamento para cada grupo. Após isso os ovócitos foram transferidos para suas respectivas gotas de maturação, contendo 150µL do meio de maturação de cada tratamento, imersas sob óleo mineral em uma placa de Petri de 60mm.

### 3.4. Maturação *in vitro*

O meio de maturação padrão do Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Cenargen, do qual foi utilizado na realização do experimento consiste de TCM 199 com sais de Earl's suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 0,01 UI/mL de hormônio folículo estimulantes (FSH), 0,1mg/mL de L-glutamina, 0,1µg/mL de cisteamina e 0,0755mg/mL de sulfato de amicacina. Nos tratamentos que havia a presença de ITS foi adicionado 0,5µg de ITS a cada mL de meio de maturação já pronto.

Os quatro tratamentos utilizados do meio de MIV para o experimento ficaram armazenados à 4°C até o dia do uso. No dia do uso do meio foi separado em eppendorf a

quantidade necessária para ser usada, e posta para estabilizar por no mínimo 2 horas antes do uso na estufa de estabilização. Com isso os ovócitos previamente selecionados permaneceram nas gotas de maturação de 150 µL, por 22 horas, à 38,8°C e com 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.5. Fecundação *in vitro*

O meio de fecundação *in vitro* utilizado para a realização do experimento foi o mesmo utilizado na rotina do Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Cenargen. O meio de fecundação (FEC final) consiste em meio TALP suplementado com 2mM de penicilamina, 1mM de hipotaurina, 250mM de epinefrina e 10µl de heparina. Por tanto a cada manipulação foi preparado o meio de fecundação final (FEC final) que consistia em: 900µl meio de fecundação, 40 µl de PHE (penicilamina, hipotaurina e epinefrina) e 10µl de heparina. Após o período da maturação os ovócitos foram retirados das gotas de maturação, lavados em uma gota de meio FEC final e transferidos para as gotas do mesmo meio em placas sob óleo, antes da preparação do sêmen.

Para a seleção espermática foi utilizado a técnica do Mini-Percoll, onde são utilizados dois gradientes do meio Percoll: 45% e 90% para a seleção e logo após lavagem com o meio CAP (meio de lavagem e manutenção). O meio Percoll e o meio CAP foram estabilizados previamente em estufa em uma temperatura de 38,8°C e a 5% de CO<sub>2</sub> até o seu uso. As palhetas de sêmen foram descongeladas em banho-maria à 36°C por 30 segundos. Logo após o descongelamento foi avaliado a motilidade e o vigor no microscópio, o sêmen que possuía motilidade maior ou igual a 30% e o vigor maior ou igual a 2 foram utilizados. Depois da avaliação inicial o sêmen foi colocado levemente sobre a coluna de Percoll, previamente preparada e estabilizada, e centrifugado à 5000g por 5 minutos. Após a centrifugação, o pellet foi retirado e ressuspendido em 1mL de meio CAP, previamente estabilizado, e então centrifugado novamente a 5000g por 5 minutos. Após a segunda centrifugação o sobrenadante foi retirado e foi acrescentado em torno de 100µl de FEC final. Para a contagem da concentração espermática na câmara de Newbauer, foi adicionado 5µl do sêmen já ressuspendido em FEC final, em 95µl de água (1:20).

Foi avaliado novamente a motilidade e o vigor do sêmen ressuspendido com FEC final para acrescentar o que falta para completar 100% de espermatozoides vivos com movimento progressivo do valor obtido na leitura, acrescentando esse valor na dose inseminante. A dose inseminante adicionada nas gotas de fecundação possuíam uma concentração final de  $1,0 \times 10^6$  SPTZ/mL. Após toda preparação e calculado a dose inseminante, as gotas de fecundação já

com os ovócitos são inseminadas, onde ficaram co-incubadas por 18 horas, em estufas em temperatura 38,8°C e a 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.6. Cultivo *in vitro*

O meio de cultivo *in vitro* utilizado é o Fluido Sintético de Oviduto (SOF) suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais, 0,34 mM de sodium tri citrato, 2,77 mM de myo-inositol, 5% de SFB. Após a fecundação *in vitro*, os prováveis zigotos foram retirados do meio de fecundação final, levemente pipetados e lavados em 2 gotas de meio SOF, para a retirada de espermatozoides, e transferidos para as gotas de cultivo. Nessa etapa os possíveis embriões e embriões em desenvolvimento ficaram encubados até o D7 (dia 7), considerando o D0 (dia 0) o dia da fecundação *in vitro*, em atmosfera gasosa à 5% de CO<sub>2</sub> com temperatura de 38,8°C.

Em D2 (dia dois), os zigotos foram avaliados quanto à sua clivagem. Foi registrado o número total de ovócitos clivados, número de ovócitos com duas células e número de ovócitos com 4 ou mais células. Também foi avaliado e registrado a taxa de blastocistos em D6 e D7.

### 3.7. Coloração diferencial

Após serem avaliados em D7 os blastocistos expandidos foram separados para a coloração diferencial. Eles foram retirados das gotas de cultivos e banhados 3 vezes em gotas com Phosphate Buffered Saline (PBS) sem magnésio e sem cálcio com Polivinilpirrolidona (PVP) numa proporção de 0,05 PVP em 50mL de PBS, previamente aquecidas à 36°C, para a retirada do meio de cultivo. Após os banhos os blastocistos foram colocados em uma gota de 400µl contendo Iodeto de Propídio (100mg/mL) previamente preparada e aquecida à 36°C durante 30 segundos. Após os 30 segundos os embriões foram banhados 3 vezes novamente em PBS/PVP sem magnésio e sem cálcio e colocados em uma gota de 400µl contendo Hoescht 33342 (5g/mL) previamente preparada e aquecida à 36°C durante 15 minutos. Após os 15 minutos os embriões foram banhados mais 3 vezes em PBS/PVP sem magnésio e sem cálcio e colocados sobre uma lâmina contendo SlowFade (A: glycerol/PBS), e delicadamente tampados com uma lamínula.

As lâminas foram avaliadas e tanto o número total de células coradas com Iodeto de Propídio, tanto o número total de células coradas com Hoescht foram contabilizadas e registradas. A massa células interna de cada embrião também foi calculada a partir da equação:

$\frac{n^{\circ} \text{ de } \textit{cél.Hoescht} - n^{\circ} \text{ de } \textit{células Iodeto}}{n^{\circ} \text{ de } \textit{cél.Hoescht}}$ , sendo que o um resultado ideal é entre 20-40% para que o embrião seja considerado de qualidade.

### 3.8. Análise estatística

Ambos utilizando 5% de significância ( $p=0,05$ ). As avaliações estatísticas foram feitas no programa “R Studio”, versão 4.0.4, 2021. Para a análise estatística da produção *in vitro* de embriões com seus devidos tratamentos foi realizado o teste ANOVA. Já para a avaliação de qualidade embrionária foi realizado o teste de Kruskal-Wallis para a avaliação estatística.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro experimento proposto foi feita a avaliação da produção *in vitro* de embriões bovinos com os devidos tratamentos. Os embriões foram avaliados em três dias, em D2 para avaliação de clivagem onde foi visualizado os embriões que clivaram e os que não clivaram, isso nos traz uma ideia de como será a produção final visto a porcentagem da avaliação de clivagem. E em D6 e D7 e classificados como BI (blastocisto inicial), BL (blastocisto), BX (blastocisto expandido), BN (blastocisto em eclosão) e BE (blastocisto eclodido). Como descrito na Tabela 1 abaixo, onde foi observado que nenhum tratamento obteve diferença estatística entre eles, conseqüentemente mostrando que o uso do ITS como suplementação no meio de maturação *in vitro* não aumenta as taxas de clivagem e nem as taxas de produção de embriões bovinos.

Tabela 1: Mensuração da produção de embriões de acordo com os tratamentos.

Grupos	N. ovócitos	Clivagem D2 (%)	D6					D7				
			Bi	Bl	Bx	Bn/Be	Total	Bi	Bl	Bx	Bn/Be	Total
-CIS-ITS	116	84(72± 5%)	7(6%)	5(4%)	4(3%)	0(0%)	16(19%)	3(3%)	10(7%)	25(22%)	3(3%)	41(35± 7%)
+CIS-ITS	131	97(74± 6%)	8(6%)	8(6%)	2(2%)	0(0%)	18(19%)	13(10%)	17(13%)	23(18%)	3(2%)	56(43± 7%)
+CIS+ITS	122	88(72± 7%)	7(6%)	6(5%)	0(0%)	0(0%)	13(15%)	5(4%)	19(16%)	12(10%)	1(0,8%)	37(30± 14%)
-CIS+ITS	117	84(72± 8%)	10(9%)	5(4%)	4(3%)	0(0%)	19(23%)	6(5%)	14(12%)	19(16%)	2(2%)	41(35± 14%)

Dados avaliados pelo teste ANOVA ( $p>0,05$ ). CIS: cisteamina; ITS: insulina transferrina selênio; D2: dia dois; D6: dia seis; D7: dia sete; BI: blastocisto inicial; BL: blastocisto; BX: blastocisto expandido; BN: blastocisto em eclosão; BE: blastocisto eclodido.

No segundo experimento foi realizado a coloração diferencial, onde foi possível contabilizar o número de células totais, o número de células do trofoblasto e a razão da massa celular interna de cada embrião no estágio de blastocisto expandido. Onde a razão da massa celular interna e a quantidade de células totais dos embriões estão diretamente relacionadas a qualidade embrionária, pois com um maior número de células, o embrião possui uma maior probabilidade de manter a gestação (PEREIRA et al., 2005). Porém como demonstrado na Tabela 2, abaixo, o uso do ITS como suplementação no meio de maturação *in vitro* de ovócitos bovinos não obteve melhoras significativas quanto ao número total de células, nem no número total de

células do trofoblasto e nem na razão da massa celular interna dos embriões produzidos. Sugerindo que o ITS não interfere na qualidade embrionária.

Tabela 2: Contagem de células pela coloração diferencial em embriões bovinos para avaliação de qualidade.

Grupo	N. Blastocistos	N. médio de células totais	MCI (% $\pm$ SD)	Trofoblasto (n $\pm$ SD)
-CIS-ITS	49	179 $\pm$ 18	27,24 $\pm$ 7,96%	131 $\pm$ 22
+CIS-ITS	37	185 $\pm$ 12	25,29 $\pm$ 5,91%	138 $\pm$ 15
+CIS+ITS	47	181 $\pm$ 11	24,83 $\pm$ 8,02%	137 $\pm$ 16
-CIS+ITS	43	186 $\pm$ 11	26,18 $\pm$ 7,18%	137 $\pm$ 17

Dados avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p > 0,05$ ). CIS: cistemanina; ITS: insulina transferrina selênio; N: número; MCI: massa celular interna.

De acordo com Pereira et al. (2013), o uso do ITS como suplementação no meio de maturação *in vitro* de ovócitos bovinos e/ou no meio de cultivo *in vitro* de embriões bovinos não obteve diferença estatística na produção de embriões e nem na qualidade embrionária. Diferentemente de Jeong et al. (2008) que testou o uso de ITS como suplementação do meio de maturação *in vitro* de ovócitos suínos e obteve uma melhora nas concentrações de glutatona ovocitária, um antioxidante muito importante que atua contra o estresse oxidativo, tendo um aumento também no desenvolvimento embrionário.

Um fator que pode explicar a diferença nos resultados encontrados foi o tempo de maturação dos ovócitos suínos que é superior ao tempo de maturação dos ovócitos bovinos, o que pode levar a um estresse oxidativo maior por conta do acúmulo de radicais livres durante esse tempo, fazendo com que a ação do antioxidante ITS seja mais significativa (HAFEZ, 2004).

Outro fator visualizado como justificativa para tal resultado, foi o uso do SFB como fonte proteica para o meio de maturação *in vitro*. O SFB é uma substância que possui sua composição indefinida, apesar de ser composta por hormônios, vitaminas, proteínas, vitaminas e outros componentes, não se sabe ao certo a quantificação de cada componente, por se tratar de uma substância produzida a partir do sangue total coagulado coletado de fetos (GONÇALVES et al., 2002). Portanto, é possível que o soro fetal por ser um composto indefinido, possua alguma substância que disfarce ou mimetize os efeitos do ITS no sistema de maturação *in vitro*.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que a presença do ITS por si só no meio de maturação *in vitro*, não foi suficiente para melhorar as taxas de produção de embriões *in vitro* e nem melhorar a qualidade embrionária. Portanto, há uma necessidade de mais estudos para avaliar outras vias e associações em que o ITS poderia ser funcional, bem sua utilização em outras concentrações ou em vias de uso como no cultivo *in vitro*, ou associação de seu uso nas duas etapas, maturação e cultivo *in vitro*.

## REFERÊNCIAS

- ACQUA, P. C. D.; MINGOTI, G. Z.; NUNES G. B.; QUEIROZ, I. F.; SILVA, C. R. **Estresse Oxidativo Na Produção In Vitro De Embriões**. IV Congresso Nacional De Pesquisa Multidisciplinar, Pesquisa UNIFIMES. 2022.
- ADONA, P. R.; BARROS, F. D. A.; GUEMRA, S.; LEAL, C. L. V.; LOPES, F. G.; MONZANI, P. S.; SOVERNIGO, T. C. **Effects of supplementation of medium with different antioxidants during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production**. *Reproduction in Domestic Animals*, [s. l.], p. 1-9, ago. 2017.
- 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 Braileira de Reprodução Animal*, v. 34, n. 2, p. 79-85, 2010.
- ANDRADE, G. M.; BOMFIM, M .M; COLLADO, M. D.; FONTES, P. K.; MEIRELLES, F. V.; NOGUEIRA, M. F. G.; PERECIN, F.; SANGALLI, J. R.; SILVEIRA, J. C. **Antioxidant responses and deregulation of epigenetic writers and erasers link oxidative stress and DNA methylation in bovine blastocysts**. *Mol. Reprod. Dev*, [s. l.], v. 12, ed. 84, p. 1296-1305, dez. 2017.
- ARAÚJO, V. R.; DUARTE, A. B. G.; FIGUEIREDO, J. R.; LOPES, C. A. P.; SILVA, G. M. **Papel dos antioxidantes no cultivo in vitro de células ovarianas**. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v. 35, ed. 3, p. 315-326, jul./set. 2011.
- ASSUMPÇÃO, M. E. O. D.; NICHI, M.; SIMÕES, R.; SIQUEIRA, A. F. P.; VISINTIN, J. **A. Qualidade da cromatina espermática e sua implicação no desenvolvimento embrionário inicial de bovinos**. *Reprodução Animal*, São Paulo, v. 12, ed. 3, p. 18-35, 2014.
- BACZKOWSI, T.; GLABOWSKI, W.; KURZAWA, R.; MARCHLEWICZ, M.; WISZNIEWSKA, B. **Growth factors protect in vitro cultured embryos from the consequences of oxidative stress**. *Zygote*, [s. l.], v. 12, ed. 3, p. 231-240, ago. 2004.

BAO, J. C. et al. **Insulin–transferrin–selenium (ITS) improves maturation of porcine oocytes in vitro.** *Zygote*, [s. l.], v. 19, p. 191-197, fev. 2011.

BARMEJ-ÁLVAREZ, P.; GUTIÉRREZ-ADAN, A.; LONERGAN, P.; RIZOS, D. **Low oxygen tension during IVM improves bovine oocyte competence and enhances anaerobic glycolysis.** *Reproductive Biomedicine Online*, [s. l.], p. 341-349, mar. 2010.

BARNES, D.; SATO, G. **Methods for growth of cultured cells in serum medium.** *Analytical Biochemistry*, v.102, p.255-270, 1980.

BARRETA, M. H.; GASPERIN, B. G.; GONÇALVES, P. B. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; RISSI, V. B.; SUDANO, M. J. **Produção in Vitro de Embriões.** In: FIGUEIREDO, J. R.; GASPERIN, B. G.; GONÇALVES, P. B. D. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal e à humana.** 3. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2021. p. 249-296.

BLAIR, R. M.; BROUSSARD, J. R.; GODKE, R. A.; HANSEL, W.; LIM, J. M.; RANDEL, R. D.; ROCHA, A.; ROUSSEL, J. D. **High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows.** *Theriogenology*, [s. l.], v. 3, ed. 49, p. 657-665, fev. 1998.

BOMFIM, M. M. **Efeitos do estresse oxidativo durante a produção in vitro de embriões bovinos sobre o miR-199a e genes alvo ERBB2 e ERBB3.** 2017. 160 f. DISSERTAÇÃO (Mestrado - Programa de Pós-graduação em Biociência Animal) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Pirassununga/SP, 2017.

CAMARGO, L. S. A.; FERREIRA, A. M.; FILHO, V. R. V.; RAMOS, A. A.; SÁ, W. F.; VIANA, J. H. M. **Factors influencing in vitro embryo production.** *Anim. Reprod.*, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 19-28, jan./mar. 2006.

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.

COSTA, N. M. B.; MATTA, L. P.; PELÚZO, M. C. G.; QUEIROZ, J. H.; QUEIROZ, M. E. L. R.; RIBEIRO, S. M. R. **A Formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico.** Biosci. J., Uberlândia, v. 21, ed. 3, p. 133-149, set./dez. 2005.

CÓRDOVA, B.; IZQUIERDO, D.; MOGAS, T.; MORATÓ, R.; PARAMIO, T. **Effect of the addition of insulin-transferrin-selenium and/or L-ascorbic acid to the in vitro maturation of prepubertal bovine oocytes on cytoplasmic maturation and embryo development.** Theriogenology, [s. l.], v. 74, ed. 8, p. 1341-1348, nov. 2010.

CROCOMO, L. F.; BICUDO, S. D.; FILHO, W. C. M.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. **Produção De Embriões In Vitro: Estresse Oxidativo E Antioxidantes.** Veterinária e Zootecnia, [s. l.], v. 19, ed. 4, p. 470-479, dez. 2012.

DALE, B.; ELDER, K.; MENEZO, Y. J. R.; SILVESTRIS, E. **Oxidative stress and alterations in DNA methylation: two sides of the same coin in reproduction.** INFERTILITY REVIEW, [s. l.], v. 33, ed. 6, p. 668-683, dez. 2016.

DASGUPTA, D.; MOKASHI, R. **Assessment of impact of varied preconditioning factors, used in isolation and combination, for enhancement of cytokine secretions in stem cell conditioned medium.** Journal of Applied Biology & Biotechnology, [s. l.], v. 8, ed. 3, p. 51-56, mai./jun. 2020.

DAY, M. L.; HARDY, M. L. M.; MORRIS, M. B. **Redox Regulation and Oxidative Stress in Mammalian Oocytes and Embryos Developed In Vivo and In Vitro.** Environmental Research and Public Health, [s. l.], v. 18, p. 1-27, out. 2021.

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.

DIÓGENES, M. N.; DODE, M. A. N.; GUIMARÃES, A. L. S.; PEREIRA, S. A. **Effect of insulin-transferrin-selenium (ITS) and l-ascorbic acid (AA) during in vitro maturation on in vitro bovine embryo development.** Zygote, [s. l.], v. 24, ed. 6, p. 890-899, dez. 2016.

DODE, M. A. N.; RUMPF, R.; SARTORI, R. **Produção in vivo e in vitro de embriões bovinos.** PIRES, A. V. (Ed.). Bovinocultura de corte. Piracicaba: FEALQ, 2010. p. 561-584., [s. l.], 2010.

EBERT, R.; ULMER, M.; ZECK, S.; MEISSNER-WEIGL, J.; SCHNEIDER, D.; STOPEER, H.; SCHUPP, N.; KASSEM, M.; JAKOB F. **Selenium supplementation restores the antioxidative capacity and prevents cell damage in bone marrow stromal cells in vitro.** Stem Cells, v. 24, p.1226-1235, 2006.

EKBLOM, P. **Basement membrane proteins and growth factors in kidney differentiation.** In: TRELSTAD, R. L. **The role of extracellular matrix in development.** Liss A.R, New York, p.173-206, 1984.

FERNANDÉZ-GONZALEZ, R. *et al.* **Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring.** Biol. Reprod., [s. l.], v. 4, ed. 78, p. 761-772, abr. 2008.

FERNANDÉZ-SANTOS, M. R. *et al.* **Oxygen tension during in vitro oocyte maturation and fertilization affects embryo quality in sheep and deer.** Animal Reproduction Science, [s. l.], v. 213, fev. 2020.

FRIGONI, N. A. S. R. **Estratégias Para Minimização Do Estresse Oxidativo Em Sistemas De Produção In Vitro De Embriões Bovinos Destinados À Vitrificação.** 2016. 101 p. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária - Reprodução Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2016.

GONÇALVES, P.; VISINTIN, J.; OLIVEIRA, M.; DE MONTAGNER, M.; COSTA, L. D. **Produção de Embriões in vitro.** In: GONÇALVES, P.; FIGUEIREDO, J. D.; FREITAS, V. D. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal.** (p. 195-226). São Paulo, SP, Brasil: Varela, 2002.

GOTTARDI, P.F.; BARRETO, L.S.S.; GONÇALVEZ, 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.

GRONBAEK, H.; FRYSTYK, J.; ORSKOV, H.; FLYVBJERG, A. **Effect of sodium selenite on growth, insulin-like growth factor binding proteins and insulin-like growth factor in rats.** *Journal of Andrology*, v.145, p.105-112, 1995.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal.** 7.ed. Ed. Monole: São Paulo, 2004.

HANSEN, P. J.; MOSS, J. I.; PONTES, E. **Insulin-like growth factor-1 protects preimplantation embryos from anti-developmental actions of menadione.** *Reproductive Toxicology*, [s. l.], v. 83, p. 1001-1007, jul. 2009.

HARVEY, A. J. **The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism.** *Anim Reprod Sci.*, [s. l.], v. 1-2, ed. 98, p. 113-128, mar. 2007.

JEONG, Y. W.; HOSSEIN, M. S.; BHANDARI, D. P.; KIM, Y. W.; KIM, J. H.; PARK, S. W.; LEE, E.; PARK, S. M.; JEONG, Y. I.; LEE, J. Y.; KIM, S.; HWANG, W. S. **Effects of insulin– transferrin–selenium in defined and porcine follicular fluid supplemented IVM media on porcine IVF and SCNT embryo production.** *Animal Reproduction Science*, v.106, p.13–24, 2008.

LAGARES, M. A.; MENDONÇA, L. F.; VARAGO, F. C. **Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução.** *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, v. 32, ed. 2, p. 100-109, abr./jun. 2008.

LANDIM-ALVARENGA, F. C. **Fecundação e Clivagem.** In: LANDIM-ALVARENGA, F. C.; PRESTES, N. C. **Obstetrícia Veterinária.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 1-16. ISBN 978-85-277-3098-3. 2017.

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 receptors, 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.

PARAMIO, M. T.; SOTO-HERAS, S. **Impact of oxidative stress on oocyte competence for in vitro embryo production programs.** *Rev. Vet. Sci.*, [s. l.], v. 132, p. 342-350, out. 2020.

PEREIRA, D. C.; DODE, M. A. N.; RUMPF, R. **Evaluation of different culture systems on the in vitro production of bovine embryos.** *Theriogenology*, v. 63, n. 4, p.1131-1141, 2005.

PEREIRA, S. A. **Efeito da Presença da Insulina-Transferrina-Selênio (ITS) e L-ácido Ascórbico (AA) na Produção in vitro de Embriões Bovinos.** Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília, 2013.

SIES, H. **Oxidative stress: oxidants and antioxidants.** *Experimental Physiology*, [s. l.], v. 82, p. 291-295, mar. 1997.

SOVERNIGO, T. C. **Uso De Antioxidantes Na Produção In Vitro De Embriões Bovinos.** 2015. 50 p. Dissertação (Mestrado em Saúde e Produção de Ruminantes) - Universidade Estadual de Londrina e Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2015.

VEDELER, A.; PRYME, L. F.; HESKETH, J. E. **Insulin induces changes in the sub cellular distribution of actin and S-nucleotidase.** *Molecular and Cellular Biochemistry*, v.108, p.67-74, 1991.

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