



**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UNICEUB
FACULDADE DE CIÊNCIAS DE EDUCAÇÃO E SAÚDE**

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

HALLYA BEATRIZ SOUSA AMARAL

BRASÍLIA

2022

HALLYA BEATRIZ SOUSA AMARAL

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

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como um dos requisitos para a conclusão do curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Brasília – CEUB.
Orientador: Prof. Dr. Andrei Antonioni Guedes Fidelis.

BRASÍLIA

2022

HALLYA BEATRIZ SOUSA AMARAL

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

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como um dos requisitos para a conclusão do curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Brasília – CEUB.
Orientador: Prof. Dr. Andrei Antonioni Guedes Fidelis.

Brasília, _____ de _____ de 2022.

Banca examinadora

Prof. Dr. Andrei Antonioni Guedes Fidelis (Orientador/CEUB)

Prof^{ca}. Dra. Francislete Rodrigues Melo (Examinador interno/CEUB)

Dra. Ligiane de Oliveira Leme (Examinador externo/EMBRAPA/FAP-DF)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à toda a minha família, que sempre estiveram ao meu lado e me apoiaram durante toda faculdade, Dona Divina e Dona Lindalva, mãe, pai, Kley Sousa, Alice Amaral.

Ao meu orientador, prof. Dr. Andrei Antonioni Guedes Fidelis, por todo o apoio, carinho, conhecimentos partilhados e por toda paciência durante a faculdade e fora dela, onde literalmente foi um pai.

À Dra. Margot Dode, a Ligi e a todos os alunos da Embrapa Cenargen. Obrigada por me ajudarem nos últimos 2 anos e por todo conhecimento compartilhado e paciência.

Por fim, aos meus amigos que muitas vezes acreditaram mais em mim do que eu mesma e que fizeram esses anos serem muito mais leves e rápidos. Obrigada pelo companheirismo e por toda ajuda.

Agradeço ao João Vitor Lima Barbosa, em especial, meu companheiro de vida e melhor amigo. Todas as vezes que pensei em desistir, você me convenceu do contrário. Obrigada por tudo e espero continuar partilhando todos os momentos importantes da minha vida com você.

RESUMO

O Brasil é um importante país no desenvolvimento da produção *in vitro* de embriões (PIVE), considerado em 2014, o país que mais produziu embriões no mundo, atingindo, aproximadamente, 70% do total mundial de embriões produzidos. Apesar de todos os avanços já realizados para melhorar a produção *in vitro*, a eficiência deste processo ainda possui muitas limitações, dentre elas, as condições inadequadas de cultivo embrionário em decorrência da produção das espécies reativas de oxigênio (ERO`s), radicais livres produzidos naturalmente pelo metabolismo celular, que quando em desequilíbrio, causam danos oxidativos as células, o que prejudica o desenvolvimento embrionário. Uma das alternativas para melhorar as condições do sistema *in vitro* para os ovócitos e embriões é o uso de antioxidantes nos meios de cultivo ovocitário/embrionário. A suplementação de compostos antioxidantes durante a PIVE não só controla a produção excessiva de ERO`s, mas também pode melhorar a qualidade dos embriões. Pesquisas demonstram melhorias na qualidade embrionária quando suplementados com compostos que possuem ações antioxidantes. No entanto, nem todos os compostos antioxidantes trazem vantagens para a PIVE, dependendo de sua natureza e concentrações utilizadas. Portanto, há uma demanda em buscar compostos mais seguros e não tóxicos para o cultivo celular *in vitro* para suplementação de meios já utilizados.

Palavras-chave: ERO`s, danos oxidativos, radicais livres.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1. Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos.....	9
2.1.1. Aspiração folicular e maturação <i>in vitro</i>	10
2.1.2. Fecundação <i>in vitro</i>	12
2.1.3. Cultivo <i>in vitro</i>	13
2.2. Fatores que afetam a produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos.....	15
2.2.1. Produção de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo	16
2.3. Fatores que minimizam o estresse oxidativo	17
2.3.1. Uso de antioxidantes na produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos	18
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
4. REFERÊNCIAS	24

1. INTRODUÇÃO

Desde o final da década de 1920, há relatos de estudos relacionados com a produção *in vitro* de embriões (PIVE) em diferentes espécies de mamíferos. Publicações relacionadas à produção e transferência de embriões (TE) oriundos da década de 50 relataram um marco da PIVE com o primeiro nascimento gerado através dessa biotécnica, em um coelho. Somente na década de 80, a PIVE em bovinos tomou impulso com a produção embrionária sob condições artificiais tornando-se viável (GONÇALVES et al., 2008).

O desenvolvimento da PIVE no Brasil não só possibilitou o atual cenário tecnológico da produção pecuária, mas também corroborou com a otimização de utilização do potencial reprodutivo de fêmeas, possibilitando, assim, multiplicar matrizes geneticamente superiores (VARAGO et al., 2008; MELLO et al., 2016). Porém, apesar dos avanços da PIVE, a eficiência deste processo ainda está aquém do ideal, com uma média de 40% de produção de blastocistos viáveis para a TE (MELLO et al., 2016).

Dentre as possíveis causas que influenciam a eficácia dessa biotécnica, fatores intrínsecos presentes no sistema de *produção in vitro* de embriões, como a composição dos meios utilizados, temperatura e a atmosfera de cultivo celular são consideradas cruciais. Logo, torna-se necessário estabelecer uma maturação/cultivo *in vitro* adequados, proporcionando ao gameta um ambiente mais próximo do considerado ideal (CAIXETA e DODE, 2010; GOTTARDI e MINGOTI, 2009; LONERGAN e FAIR, 2008). Um dos fatores limitantes da PIVE é a ineficiência de sistemas de defesas contra as espécies reativas de oxigênio (ERO's) nos meios de cultivos rotineiramente utilizados, o que torna essencial uma suplementação com antioxidantes (TAKAO et al., 2015).

Os antioxidantes utilizados na PIVE são fundamentais, visto que as espécies reativas de oxigênio têm alta reatividade com componentes essenciais das células. Dessa forma, esses radicais livres possuem alta capacidade de interagir com o DNA e lipídeos, os quais afetam a estrutura e permeabilidade das membranas celulares, o que ocasiona um maior índice de apoptose e uma interrupção ou atraso no desenvolvimento embrionário inicial (ANDRADE et al., 2010; RIBEIRO, 2005).

Visto a importância da suplementação de compostos antioxidantes nos meios da PIVE, alguns estudos mostram a utilização dos antioxidantes no meio de maturação e/ ou no meio de cultivo, como a cisteamina, cisteína, ácido ascórbico, β -mercaptoetanol, glutathiona, cistina, L-cisteína. Ou o uso de taurinas e hipotarinas na fecundação *in vitro* são alguns dos compostos antioxidantes usados hoje, a fim de promover maiores taxas de produção de blastocistos e

qualidade embrionária. Muitos dos antioxidantes usados são relacionados às defesas naturais já existentes presentes no desenvolvimento *in vivo*, no entanto nem todos os compostos e nem todas as concentrações desses compostos antioxidantes trazem vantagens para a PIVE, logo, há uma exigência em buscar novos compostos que sejam mais eficientes, estáveis, seguros e não tóxicos, através de estudos, com o propósito de suplementar os meios já utilizados (FIDELIS et al., 2014; SMITH e MONTEIRO, 2012).

O objetivo do proposto trabalho foi realizar uma revisão de literatura sobre o uso de antioxidantes na produção *in vitro* de embriões bovinos, além de descrever os principais antioxidantes utilizados, suas vias de utilização e suas propriedades moleculares.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Produção *in vitro* de embriões bovinos

A PIVE consiste em diversas etapas, que contemplam desde a aspiração de ovócitos até o cultivo *in vitro* de embriões (GONÇALVES et al., 2008). Cada um desses estágios possui meios de cultivo celular (Tabela 1) com diferentes suplementações e processos utilizados, com intuito de atender as demandas biológicas e físico-químicas do embrião no seu estágio inicial de desenvolvimento e dos ovócitos no processo de competência ovocitária, levando em consideração que apenas os ovócitos que adquirirem a competência ovocitária possuem a capacidade de completarem a divisão meiótica, serem fecundados, formarem pró-núcleos, suportar o desenvolvimento embrionário e após a transferência, gerar proles viáveis (CAIXETA e DODE, 2010; GONÇALVES et al., 2008; VARAGO et al., 2008).

Tabela 1: Meios de cultivo celular utilizados nos meios de produção *in vitro* de embriões e suas suplementações de acordo com EMBRAPA gado de leite (Juiz de Fora – MG).

Etapa	Meio	Suplementação
MIV	Tissue Culture Medium 199 (TCM 199), Synthetic Oviductal Fluid (SOF), Ham's F-12.	Soro Fetal Bovino (SFB), Albumina sérica bovina (BSA), LH, FSH, 17- β -estradiol, lactato, piruvato, L-glutamina, bicarbonato de sódio, vitaminas e antibióticos.
FIV	Tyrode-Albumina-Lactato-Piruvato (TALP).	Heparina, penicilamina, hipotaurina, epinefrina, lactato, piruvato.
CIV	Synthetic Oviductal Fluid (SOF).	Aminoácidos, SFB, BSA, Piruvato, Lactato e glutamina.

Legenda: MIV – maturação *in vitro*, FIV – fecundação *in vitro*, CIV – cultivo *in vitro*. *Meios e suplementações podem variar de acordo com o laboratório. **Fonte:** Adaptado de VARAGO et al., 2008 e GONÇALVES et al., 2008.

Em mais detalhes as etapas da PIVE abrangem a obtenção de ovócitos, maturação *in vitro* (MIV) desses ovócitos imaturos que foram obtidos, preparação espermática para a fecundação *in vitro*, a fecundação *in vitro* (FIV) dos ovócitos maturados e o cultivo *in vitro* (CIV) dos possíveis zigotos obtidos através da fecundação, zigotos esses que irão se desenvolver até os estágios de blastocistos. Nesta fase da PIVE, configura-se o estágio esse ideal para a transferência para fêmeas receptoras previamente sincronizadas (GONÇALVES et al., 2008).

2.1.1. Aspiração folicular e maturação *in vitro*

A aspiração folicular pode ocorrer de duas formas, a partir de ovários de fêmeas de abatedouro ou por aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia em animais vivos (*in vivo*). No método de obtenção de ovócitos através da aspiração folicular, a punção dos ovócitos é realizada através da aspiração transvaginal, feita por uma guia que acopla a agulha sendo auxiliada por ultrassom inserido no fundo de saco vaginal (AHUMADA et al., 2013; GONÇALVES et al., 2008).

No outro método, é feita a punção de ovócitos a partir de ovários coletados imediatamente após o abate e, em laboratório, os folículos são aspirados com auxílio da bomba de vácuo ou seringa com agulha 18G, com a pressão ideal para que não desnude os ovócitos. Nesse método, o transporte dos ovários para o laboratório é realizado em solução salina (0,9% de NaCl) aquecida de 30-36°C, podendo ou não conter antibióticos. Após higienização dos ovários, os folículos com tamanho de 2-8mm são aspirados (GONÇALVES et al., 2008; MELLO, 2016; VARAGO et al., 2008).

Folículos de 2 a 8 mm são considerados folículos viáveis para aspiração já que, folículos menores que 2 mm, geralmente, ainda não são competentes para seguirem no processo de maturação, pois ainda não atingiram o seu crescimento ideal, e folículos maiores que 8 mm podem estar em processo de atresia, morte celular, em processo de divergência e dominância ou em processo de maturação (GONÇALVES et al., 2008; SARTORI et al., 2010).

Após a aspiração, os ovócitos obtidos passam pelos procedimentos de rastreamento, e os ovócitos de qualidade I a III obtidos (Tabela 2) são selecionados e colocados para a maturação *in vitro* (GONÇALVES et al., 2008; MELLO, 2016; VARAGO et al., 2008).

Tabela 2: Avaliação da qualidade de ovócitos quanto à apresentação das células do cumulus e citoplasma.

Qualidade	Células do cumulus	Citoplasma
Grau 1	Três ou mais camadas de células compactadas.	Regular.
Grau 2	Uma a três camadas de células do cumulus.	Regular ou com granulações finais
Grau 3	Menos de três camadas de células do cumulus ou parcialmente desnudos.	Irregular.
Grau 4	Desnudos.	Irregular. Degeneração severa (citoplasma heterogêneo com granulações severas).

Fonte: Adaptado do Manual da IETS (International Embryo Transfer Society), 2010. Traduzido para o português.

Diferentes tipos de meios utilizados na MIV já foram descritos, os mais comuns são suplementados com TCM 199, soro fetal bovino (SFB), gonadotrofinas (FSH, LH e 17- β -estradiol), aminoácidos (L-glutamina, piruvato de sódio, lactato), vitaminas e antibióticos para tentar replicar o ambiente *in vivo* onde os ovócitos ganham sua capacidade para serem fecundados e se desenvolverem (VARAGO et al., 2008). Outros quesitos utilizados estão vinculados com as tensões de O₂ a 20% e CO₂ a 5%, umidade saturada e temperatura de 39°C (GONÇALVES et al., 2008).

Essa etapa ocorre durante o período de 22 a 24 horas onde ocorrem várias mudanças nos ovócitos, como por exemplo mudanças nas células do cumulus. As células do cumulus estão ligadas ao ovócito proporcionando a passagem de metabólitos, íons e aminoácidos que atuam como reguladores da maturação ovocitária (FAIR, 2003; KRISHER, 2004). Assim, o complexo cumulus-ovócito (COC) passa por um espaçamento, onde as células do cumulus secretam ácido hialurônico, causando uma expansão entre elas, um dos indícios da maturação ovocitária (GONÇALVES et al., 2008, VARAGO et al., 2008).

Outras mudanças que ocorrem na maturação são atreladas aos diversos processos citoplasmáticos e nucleares que os ovócitos irão passar. Tais processos, quando relacionados ao núcleo, vão ocorrer em função da retomada da meiose, a partir da quebra da vesícula germinativa e desenvolvimento até a metáfase II. Entre as diversas alterações do citoplasma, uma das mais importantes é a realocação dos grânulos corticais proximal à membrana com o intuito de evitar poliespermia, processo importante para a fecundação *in vitro*. Nessa fase também se relaciona a reserva de proteínas, RNAm e transcritos produzidos antes da maturação com importante objetivo para que o zigoto possa suportar a transição materno-zigótica (TMZ) e se desenvolver como embrião (FERREIRA et al., 2009; GONÇALVES et al., 2008; VARAGO et al., 2008).

Na MIV, os radicais livres em altas concentrações levam a danos oxidativos severos, comprometendo a obtenção da competência ovocitária e, conseqüentemente, o desenvolvimento embrionário inicial. Peroxidação lipídica de membranas plasmática e mitocondrial, danos no DNA e no retículo endoplasmático são algumas das conseqüências do estresse oxidativo causado pelas ERO`s. Outros danos citados são desnaturação proteica e alterações no fuso meiótico, que pode favorecer a geração de mais radicais livres e dessa forma aumentar suas concentrações, gerando um maior estresse oxidativo (AGARWAL et al., 2005; CROCOMO et al., 2012).

2.1.2. Fecundação *in vitro*

A preparação do ambiente de fecundação e capacitação espermática compõem o próximo passo. O meio de fecundação *in vitro* deve conter as condições necessárias para a manutenção do metabolismo do COC e manter uma função espermática eficiente. O meio mais utilizado é o FERT-TALP (Tyrode-albumina-lactato-piruvato) preparado e suplementado com heparina, que realiza a capacitação espermática, visto que os componentes presentes no sistema reprodutor feminino fazem essa função *in vivo* (GONÇALVES et al., 2008; VARAGO et al., 2008). Outros suplementos que podem ser adicionados ao meio de fecundação *in vitro* para melhorar desempenho espermático são compostos como a pencilamina, a hipotaurina e epinefrina, que aumentam a atividade espermática. Essa fase dura entre 12 e 22 horas, com ambiente de estufa semelhante ao ambiente da MIV (MELLO, 2016 e GARCIA, 2004).

As gotas de fecundação, que possuem os ovócitos maturados, recebem os espermatozoides previamente selecionados. Para isso são utilizados espermatozoides de palhetas, convencionais ou sexadas, de sêmen congelado. Na seleção espermática, os métodos mais utilizados são o gradiente de densidade *Percoll* e a migração ascendente *Swim-up*. No método de *Swim-up*, os espermatozoides são colocados no fundo de tubo contendo meio de preparação de sêmen, por aproximadamente, 1 hora na estufa em suas condições. Após esse tempo os espermatozoides viáveis migram para a porção superior do líquido (porção recuperada e aproveitada para a realização da fecundação *in vitro*), os espermatozoides mortos ficam concentrados no meio do líquido, local chamado de meio diluidor, e os demais compostos no sêmen ficam retidos no final do tubo (GONÇALVES et al., 2008; MELLO, 2016; VARAGO et al., 2008).

Outro método utilizado para a seleção espermática é o Washing. Nesse método os espermatozoides são lavados em um meio artificial e centrifugado para concentrar os espermatozoides no fundo do tubo. Porém esse método não seleciona populações viáveis de espermatozoides das possíveis sujidades que possuem no sêmen como, leucócitos, células epiteliais, resíduos e contaminações (SOMFAI et al., 2002).

No método *Percoll*, os espermatozoides são selecionados a partir da passagem deles através de diferentes densidades de gradiente. O *Percoll* é um composto com partículas sílicas e coloidais preparado em duas concentrações, 45% e 90%, nessa sequência, responsável por selecionar espermatozoides viáveis. O sêmen é adicionado na superfície da solução *Percoll* 45% e centrifugado, após a centrifugação é formado um *pellet* de espermatozoides viáveis no fundo do tubo, espermatozoides esses que conseguiram passar pela solução de 90% e espera-se

que estejam viáveis para serem utilizados na FIV (de SOUZA E ABADE, 2018; GONÇALVES et al., 2008; MELLO, 2016; VARAGO et al., 2008).

A concentração espermática é ajustada entre 1 e 2×10^6 espermatozoides viáveis/mL na dose inseminante, definida a partir da contagem do número de espermatozoides em uma câmara de Neubauer, diluídos (95:5) em água destilada. A dose inseminate é adicionada às gotas de fecundação onde os ovócitos maturados estão, assim, espermatozoides se ligam a receptores da zona pelúcida e iniciam o processo de reação acrossômica, onde ocorre a fusão do acrossomo com a membrana plasmática do ovócito (GONÇALVES et al., 2008; MELLO, 2016; VARAGO et al., 2008; SARTORI et al., 2010).

Na fecundação *in vitro*, o estresse oxidativo pode trazer danos irreversíveis a partir do momento em que os níveis de oxigênio, essenciais para manutenção das funções dos espermatozoides, estão elevados, aumentando as concentrações de ERO`s. O estresse oxidativo pode afetar a qualidade do sêmen, diminuindo a motilidade de espermatozoides, impedindo a respiração espermática, causando lesões no DNA espermático e mitocondrial, inibindo enzimas intracelulares que são essenciais para a fecundação durante a FIV (ANDRADE et al., 2010).

2.1.3. Cultivo *in vitro*

Essa etapa corresponde ao desenvolvimento do zigoto até o estágio de blastocisto (BL). Nesta etapa, é necessário um suporte nutricional adequado para suprir todas as necessidades do embrião em seu desenvolvimento. Por isso o meio de cultivo SOF (Fluído de oviduto sintético) foi criado baseado na composição do fluído do oviduto *in vivo*, suplementado com fontes proteicas como SFB ou BSA (Albumina sérica bovina), é o mais utilizado. A duração do CIV varia de 6 a 7 dias com ambiente de estufa semelhante ao ambiente de MIV e da FIV (GONÇALVES et al., 2008; MELLO, 2016; VARAGO et al., 2008).

Nesta fase que ocorre a ativação do genoma embrionário, compactação dos blastômeros na fase de mórula, início da diferenciação embrionária com a formação do blastocele e rompimento da zona pelúcida (BUENO, 2008). Também é caracterizado pelo desenvolvimento dos zigotos de blastocisto inicial (BI) para BL, BX e em blastocistos eclodidos (BE) (GOUVEIA, 2011). Considerando o D0 (dia 0) como o dia da fecundação *in vitro*, em D2 do cultivo (dia 2), é feita uma avaliação de clivagem, quantos embriões possuem de 2 ou mais células. Em D6 (Dia 6), do cultivo *in vitro* é avaliado quanto a evolução do embrião pela compactação dos blastômeros e desenvolvimento da blastocele, e em D7 (Dia 7) é feita uma

avaliação embrionária final para a transferência ou para criopreservação (THOMPSON, 2000). Permanências por 8 ou 9 dias podem ocorrer para verificar taxas de BE (VARAGO et al., 2008).

Durante o CIV em embriões bovinos, é relatado que em embriões na fase de 2 células são mais sensíveis aos danos oxidativos, quanto aos danos no DNA e indução de apoptose, causado pelas altas concentrações de ERO's quando comparados aos embriões com mais células (9-16 células). Logo, o estágio com 2 células dos embriões pode ser considerado como ponto crítico durante o desenvolvimento de embriões, ponto esse antecessor da ativação do genoma embrionário, de 8 a 16 células (MORALES et al, 1999).

2.1.3.1. Classificações dos Embriões

A classificação é feita pelas condições morfológicas que os embriões se encontram e suas variações durante seu crescimento. Os parâmetros avaliados são: formato, simetria, coloração, extrusão celular e integridade da zona pelúcida. Esses aspectos morfológicos estão diretamente relacionados com a viabilidade e efetividade do desenvolvimento do embrião (MARTINEZ e SOUZA, 2007).

Na tabela 3 pode-se observar os critérios recomendados pela Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS) para a classificação morfológica embrionária propostos pela EMBRAPA Gado de Leite (Juíz de Fora – MG) 2014. Taxas apoptóticas das células embrionárias também é um indicador de qualidade, assim como o número de células embrionárias e a expressão dos genes importantes para o seu crescimento, porém, esses métodos são apenas indicadores já que não podem ser realizados em embriões vivos (DODE e CARVALHO, 2014).

Após selecionados os embriões ficam em cultivo, onde continuam a se desenvolver, ocorrendo um aumento progressivo do número de blastômeros, posteriormente a compactação das células mais externas e a formação da blastocele, são alguns dos processos que os embriões passam para atingirem a fase de blastocisto. Blastocistos são conjuntos de blastômeros bem desenvolvidos que possuem uma camada mais exterior, o trofoblasto, um conjunto de células em seu interior denominada embrioblasto e uma cavidade com líquido, a blastocele. O aumento da blastocele e o aumento do número total de células do trofoblasto farão com que o BL expanda tornando-se BX (GONÇALVES et al., 2008; REECE, 2008).

Tabela 3: Classificação dos embriões quanto à qualidade.

Código	Classificação	Descrição
1	Excelente ou bom	Massa embrionária simétrica e esférica, com blastômeros uniformes em tamanho, cor e densidade. Estádio de desenvolvimento adequado. Ao menos 85% do material celular viável, poucas células extrusas. Zona pelúcida lisa.
2	Regular	Irregularidades moderadas na forma, tamanho da massa embrionária, na cor e densidade das células individuais. Ao menos 50% do material celular viável.
3	Pobre	Irregularidades maiores na forma da massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade das células individuais. Ao menos 25% do material celular viável.
4	Morto ou degenerado	Embriões não viáveis, ou com desenvolvimento parado e/ou muito atrasado.

Fonte: Adaptado do Manual da IETS (International Embryo Transfer Society), 2010. Traduzido para o português.

Problemas no desenvolvimento e formação de embriões classe 1 ou 2 podem estar amplamente relacionados com estresse oxidativo ligado a radicais livres. As ERO`s, radicais livres, interagem com as biomoléculas, principalmente DNA e lipídeos. Consequências dessas interações são morte celular e peroxidação lipídica, assim diminuindo a qualidade dos embriões (GONÇALVES et al., 2008; REECE, 2008).

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

A PIVE é um processo que está sujeito a alterações biológicas que afetam a evolução de um embrião no cultivo, causadas por fatores intrínsecos e extrínsecos (BUENO, 2008). A PIVE pode ser afetada por uma série de fatores como: temperatura, pH, osmolaridade, tensão de CO₂ e altas tensões de O₂, composição dos meios utilizados, exposição à luz, entre outros fatores. Um fator muito importante e prejudicial é a quantidade de ERO`s, que são produtos do metabolismo celular natural, e que causam estresse oxidativo em ovócitos e embriões. A alta tensão de O₂ causa danos oxidativos nos lipídios das membranas celulares, danos no DNA, além de induzir apoptose celular. Diante de tal fato, é necessário o controle da concentração de O₂ no sistema *in vitro* da PIVE, para não comprometer o desenvolvimento do embrião (SILVA et al., 2010). Assim, o melhor ambiente atmosférico de estufa é o de baixa tensão, utilizando 5% de O₂, 5% CO₂ e nitrogênio balanço, em uma temperatura de 38,5°C e umidade saturada. A tensão de O₂ é mais baixa para evitar produção excessiva de espécies reativas de oxigênio,

porém ainda não é muito utilizada pelo alto preço dessa técnica (NOGUEIRA, 2019; VARAGO et al., 2008).

A clivagem dos blastômeros e outros diversos fenômenos podem ser afetados devido à produção de ERO`s no sistema, o que acarreta o estresse oxidativo. O ponto crítico do desenvolvimento de embriões é entre 8-16 células, onde as concentrações de espécies reativas de oxigênio estão aumentadas e o metabolismo da mitocôndria e as concentrações de antioxidantes como a glutatona, estão diminuídas. Nessa fase também ocorre a ativação do genoma embrionário, onde ocorre a substituição gradual da atividade transcricional materna pela a do próprio embrião, etapa crucial para o desenvolvimento embrionário de bovinos. Por essa razão, melhorar o ambiente de CIV e a estruturação dos meios com suplementação de aminoácidos, vitaminas, fatores de crescimento, macromoléculas e antioxidantes é uma das estratégias usadas para aprimorar a qualidade do blastocisto produzido (GONÇALVES et al., 2008; NAGAI, 2001; NOGUEIRA, 2019,).

2.2.1. Produção de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo

O estresse oxidativo é consequência do desequilíbrio da produção de ERO`s, no sistema, seja ela por fatores que aumentem a sua produção ou pelo sistema *in vitro* possuir defesas naturais ineficientes que neutralizem essas espécies, reforçando a importância da utilização de antioxidantes nos meios da PIVE. Nos sistemas da PIVE o estresse oxidativo pode ocasionar efeitos prejudiciais às células, acarretando uma baixa eficiência da maturação *in vitro* pelas alterações e mortes celulares, e consequentemente prejudicando o desenvolvimento embrionário, levando à baixas taxas de produção de blastocistos (AGARWAL et al., 2005; AGARWAL et al., 2008; FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Os radicais livres, ou ERO`s, moléculas geradas naturalmente pelo metabolismo celular, possuem funções importantes na transdução de sinais intracelulares, principalmente ligadas ao controle do ciclo celular, diferenciação e apoptose (SIES, 2017). Por ser um produto oriundo das reações intracelulares, produzido durante a produção *in vitro* e *in vivo* de embriões, a produção de ERO`s está ligada as condições ambientais que ovócitos e possíveis embriões estão submetidos (AGARWAL et al., 2005; AGARWAL et al., 2008).

A formação de ERO`s participam de processos fisiológicos como, sinalizadores celulares, participam de rotas de regeneração tecidual, foliculogênese, esteroidogênese ovariana, processos da maturação ovocitária, ovulação, formação e funcionamento de corpos

lúteos, bem como luteólise, desenvolvimento embrionário (embriogênese), implantação embrionária, manutenção da gestação e início do parto. Por outro lado, quando produzidas em quantidades exacerbadas no sistema pode ocasionar alterações e morte celular (AGARWAL et al., 2005; AGARWAL et al., 2008).

As ERO's são eletronicamente instáveis, reativas a muitos compostos próximos, elas podem causar diversas consequências, dependendo da sua atuação, agentes oxidantes que recebem elétrons, ou de agentes redutores, que doam elétrons. A mitocôndria é o principal local de sua produção, pelo processo de respiração celular, envolvendo o oxigênio (O_2). Por conta da conformação eletrônica de sua camada de valência, o O_2 retém uma alta reatividade, tal reatividade o torna um dos principais entregadores de radicais livres, tais como o radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^-) (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; MENEZO, 2016). Isso acontece em decorrência do metabolismo aeróbico, onde muitas vezes o O_2 que era para ser destinado a esse processo acaba interagindo com outras moléculas relacionadas a cadeia transportadora de elétrons, tanto de processos mitocondriais, como processos no retículo endoplasmático, formando radicais livres como a hidroxila. O radical peróxido de hidrogênio e o radical superóxido também possuem natureza citotóxicas, pois grande parte da sua conversão se dá para o radical hidroxila (AGARWAL et al., 2008; LEITE e SARNI, 2003).

2.3. Fatores que minimizam o estresse oxidativo

Como alternativas para minimizar a produção de ERO's, conseqüentemente, o estresse oxidativo, a suplementação de antioxidantes aos meios utilizados na PIVE pode ser utilizada. Visto que os ovócitos e embriões durante a sua produção *in vitro* não possuem mecanismos de defesa eficientes contra as ERO's, como no ambiente *in vivo*, os antioxidantes irão fazer essa função. Os antioxidantes atuam na manutenção do estado redução-oxidação (redox) das células, na prevenção, contra e no reparo dos danos oxidativos. Os principais antioxidantes utilizados na PIVE são a cistemanina, taurina e hipotaurina, que possuem resultados constantes de benefícios (KITAGAWA et al., 2004; ROCHA-FRIGONI et al., 2014).

Além dos antioxidantes, a utilização de fatores de crescimento como o IGF-I (Fator de crescimento tipo insulina I) na maturação *in vitro*, pode estimular o metabolismo e crescimento embrionário. O IGF-I -reduz os efeitos do estresse oxidativo, pois melhora a viabilidade embrionária, reduz taxa de apoptose, aumenta o número total de blastômeros, além de estimular

o metabolismo e desenvolvimento embrionário (KITAGAWA et al., 2004; ROCHA-FRIGONI et al., 2014). Outro fator de crescimento que pode ser utilizado na MIV são os FGF`s (Fatores de crescimento de fibroblasto) que são naturalmente produzido pelas células da teca, que estão ausentes nesse processo, e atuam em processos de multiplicação, diferenciação, sobrevivência e apoptose celular. Esses FGF`s promovem o crescimento e sobrevivência dos ovócitos, além de promover um aumento na expansão das células do cumulus (Zhang e Ealy, 2012).

Uma outra alternativa seria a diminuição da tensão de oxigênio utilizada na incubação durante a PIVE. O sistema de cultivo em alta tensão de oxigênio utiliza 20% de O₂, enquanto o sistema de baixa tensão utiliza 5% de O₂. Como dito anteriormente, um dos fatores que podem influenciar o ambiente de cultivo é a atmosfera gasosa, portanto altas concentrações de O₂ no sistema podem afetar o desenvolvimento dos embriões (YUAN, 2003).

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

Os antioxidantes são compostos principalmente por enzimas, aminoácidos, substratos energéticos e compostos fenólicos. Eles são classificados como enzimáticos e não enzimáticos, os quais agem como: sequestradores de ERO`s e quelantes. Os “scavengers” retêm os radicais livres, promovendo controle nas concentrações de ERO`s. Os quelantes formam complexos com íons metálicos, portanto eles impedem suas participações na formação de ERO`s, principalmente a hidroxila (GUTTERIDGE e HALLIWELL 2000; HOSAKA et al., 2005; LEITE, 2003).

Algumas enzimas como a superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase, peroxirredoxinas e NADPH- quinona oxidoreductase, são exemplos de antioxidantes enzimáticos que trabalham no equilíbrio de ERO`s dentro de um sistema celular (ANDRADE, 2010; LEITE, 2003; RIBEIRO, 2005).

Já os antioxidantes não-enzimáticos são compostos que atuam, principalmente, na proteção dos alvos dos processos oxidativos. Elas vão atuar na inibição e na eliminação ou inativação de ERO`s ou participando de processo de reparos de danos oxidativos. Alguns exemplos dessa classificação são: ácido ascórbico, tocoferol, selênio, zinco, taurinas e hipotaurinas, glutathione, piruvato, betacaroteno, caroteno, cistina, cisteamina, L-cisteína, entre outros (ANDRADE, 2010; LEITE, 2003; RIBEIRO, 2005).

Após determinada a suplementação dos meios de MIV e CIV com compostos antioxidantes devido a ineficiência das defesas do sistema *in vitro* contra as ERO`s, é necessário

buscar compostos antioxidantes que tenham constância, sejam seguros e com a menor toxicidade possível para os ovócitos e embriões, para a utilização. Outra evidência, que reforça a necessidade do uso de compostos antioxidantes na PIVE, é o aumento das taxas de sobrevivência pós criopreservação, uma vez que os embriões venham a ser criopreservados em estágio de BL e BX. A criopreservação possui uma importante aplicação também na preservação de espécies ameaçadas de extinção, viabilizando embriões por muito tempo (ANDRADE, 2010; FIDELIS et al., 2020).

2.3.1.1. Taurina e Hipotaurina

A hipotaurina é formada a partir da oxidação da cisteamina pelo radical hidroxila, ela atua neutralizando as ERO`s, e por isso ela rapidamente se torna em taurina. Além de atuar como sequestrador de ERO`s promove uma melhoria nas taxas de blastocisto de bovinos (MANJUNATHA, 2009). Segundo Guerin et al., 1995, o uso da hipotaurina durante o CIV promove uma melhora nas taxas de produção de embriões bovinos.

A taurina por outro lado é frequentemente utilizada nos meios da PIVE como o de fecundação *in vitro*. A taurina além de contribuir para o equilíbrio osmótico, ela possui função integradora com alguns agentes citotóxicos como os aldeídos, formados da peroxidação causadas pelas ERO`s (MANJUNATHA, 2009).

2.3.1.2. L-Carnitina

A L-Carnitina como um antioxidante não-enzimático, atua prevenindo os prejuízos dos danos oxidativos, e ajudando na beta-oxidação, principalmente na mitocôndria. Atua também na reparação de lipoperoxidação na membrana plasmática, aumenta as concentrações de glutatona e diminui as concentrações de ERO`s e reduz as taxas apoptóticas (MISHRA, 2016). De acordo com Dunning et al., 2011, o uso de L-carnitina como suplementação durante a maturação e cultivo *in vitro* aumenta a massa celular interna dos embriões, que está diretamente relacionada a qualidade embrionária, e também aumenta o desenvolvimento embrionário.

2.3.1.3. Melatonina

Sendo um hormônio produzido pela glândula pineal, a melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é considerada um antioxidante não-enzimático que atua como sequestradora de ERO's. Além disso, a melatonina participa na modulação da expressão gênica de antioxidantes enzimáticos como a superóxido dismutase. Apesar de ser um antioxidante que apresenta importantes benefícios como aumento da qualidade e criotolerância embrionária, a melatonina não participa das reações de oxirredução, pois uma vez que oxidada ela é incapaz de participar novamente, já que ela cria produtos estáveis (RODRIGUES-CUNHA et al., 2016). A adição da melatonina na maturação *in vitro* proporciona melhoras taxas de maturação ovocitária e formação de blastocistos, além de aumentar as concentrações de glutathione (TIAN et al., 2014). Já a adição de melatonina no cultivo *in vitro* proporcionou uma melhor qualidade e desenvolvimento embrionário, consequentemente uma maior criotolerância e sobrevivência dos embriões após aquecimento (WANG et al., 2014).

2.3.1.4. Ácido ascórbico (Vitamina C)

Considerado uma vitamina hidrossolúvel e um dos mais importantes antioxidantes, a vitamina C diminui as concentrações de ERO's e pode até prevenir a formação de hidroperóxido de lipídeos nas lipoproteínas plasmáticas, promovendo uma proteção aos danos oxidativos. Além disso, o ácido ascórbico pode proporcionar uma melhor qualidade e criotolerância embrionária quando adicionado aos meios de CIV (NORDBERG e ÁRNER, 2001). Em alguns trabalhos foi demonstrado que sua ação diminuiu as concentrações de espécies reativas de oxigênio e impediu a formação de hidroperóxidos de lipídeos nas lipoproteínas plasmáticas, formados a partir da lipoperoxidação lipídica, promovendo uma proteção do meio biológico contra danos oxidativos (ANNAE E CREPPY, 2001; NORDBERG E ÁRNER, 2001)

2.3.1.5. Glutathione

Encontrada nas células dos mamíferos, a glutathione é um tri-peptídeo não proteico (γ-glutamina-cisteína-glicina), que atua como reservatório de cisteamina natural e atua na regulação de síntese proteicas, retirando compostos tóxicos das células e na produção de leucotrienos. Além de estar envolvida no metabolismo do ácido ascórbico, em comunicações intercelulares, transportes intracelulares de cobre. Por isso, a presença de GSH tanto *in vitro*

como *in vivo* está diretamente ligada ao desenvolvimento ovocitário e embrionário, já que ela também diminui os efeitos citotóxicos das ERO`s. A formação da GSH está ligada a aminoácido não essenciais como glutamato, cisteína e glicina, e pode ser encontrada em duas formas: a forma reduzida (GSH), como sua forma predominante ou na forma oxidativa (GSSG) (LIVINGSTON et al., 2009; LUBERDA, 2005). De acordo com Urdaneta et al., 2004, o uso de glutathione como suplementação do meio de maturação e cultivo *in vitro*, diminui os efeitos citotóxicos causados pelas ERO`s e aumenta as produções *in vitro* de embriões bovinos.

2.3.1.6. Cisteamina

A cisteamina é um importante antioxidante que atua principalmente na redução de ERO`s, como a hidroxila. Ela atua também na conversão de glutathione oxidada para glutathione reduzida e aumenta os níveis de glutathione proporcionando uma disponibilidade maior de cisteína, um aminoácido precursor da glutathione. Ao ser oxidada pelo radical hidroxila a cisteamina é convertida em hipotaurina, outro antioxidante. Por tanto, a utilização de compostos antioxidantes nos meios da PIVE com cisteamina pode melhorar as taxas de desenvolvimento e de qualidade de embrião, já que aumenta a geração de glutathione, um importante antioxidante na maturação e no cultivo *in vitro* de embriões bovinos (DEULEZE, 2010; LOTT, 2010). De acordo com de Matos et al., (2002), o uso da cisteamina durante a MIV e/ou CIV promoveu uma melhora nas taxas de blastocisto e qualidade embrionária.

2.3.1.7. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são denominados como moléculas que possuem um grupo fenol, um anel aromático com pelo menos um grupo hidroxila, em sua composição. Podendo ser denominada como polifenóis quando possuírem mais de um grupo fenol em sua cadeia. Esses compostos podem ser extraídos e encontrados em diversas plantas e frutos, sendo responsáveis pela cor, adstringência e aroma das folhas, frutos e flores (PELEG et al., 1998 e LEOPOLDINI, 2011).

As propriedades desses compostos conferem como antioxidantes, inibidores da oxidação lipídica e contra a proliferação de fungos. Podendo ser encontrados em alimentos como a uva (vinhos), azeitona, café, chá, grãos e cereais geralmente (PELEG et al., 1998). Os compostos fenólicos podem ser divididos em quatro grupos: ácidos fenólicos, estilbenos, ligninas e flavonoides. Sendo os flavonoides o maior grupo e tendo o maior poder antioxidante,

eles conferem em sua composição uma alta capacidade de doar elétrons e átomos de hidrogênio para os radicais livres, além de possuírem uma atividade quelante de íons metálicos, o que impede a formação de radicais livres como a hidroxila, principalmente (BRAVO, 1998).

De acordo com Governigo et al., 2017, a adição de quercetina (flavonoide) e a adição de resveratrol (estilbenos), na maturação *in vitro*, reduziu significativamente a produção de ERO`s no meio biológico. Já de acordo com Wang et al., 2013, a suplementação de flavonoides extraídos do chá verde, na maturação e no cultivo *in vitro*, reduziram as taxas de células apoptóticas e aumentaram transcritos de enzimas do sistema antioxidante, além de aumentares as taxas de gestação de bovinos.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de antioxidantes na produção *in vitro* de embriões bovinos é imprescindível, visto todos os benefícios que ele promove com o objetivo de melhorar as condições do sistema *in vitro* para os ovócitos e embriões, conseqüentemente podendo aumentar as taxas de embriões e melhorar a qualidade embrionária.

Porém, apesar de todos os avanços e estudos sobre o uso de antioxidantes na produção *in vitro* de embriões bovinos, ainda é necessário a realização de mais estudos sobre as vias de utilização e as concentrações dos componentes, bem como a busca de novos compostos antioxidantes seguros para a utilização na PIVE de bovinos.

4. REFERÊNCIAS

Agarwal, A.; Gupta, S.; Sharma, R. K. **Role of oxidative stress in female reproduction.** *Reprod Biol Endocrinol*, v.3:28, 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.

Ahumada, C. J.; Salvador, I.; Cebrian-Serrano, A.; Lopera, R.; Silvestre, M. A. **Effect of supplementation of different growth factors in embryo culture medium with a small number of bovine embryos on *in vitro* embryo development and quality.** *Animal*, v. 7, p.455-462. 2013.

Andrade, E. R., Melo-Sterza, F. A., Seneda, M. M., Alfieri, A. A. **Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes.** *Revista Brasileira Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.34, n.2, p.79-85, abr/jun de 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.

Bueno, A. P. Beltran, M. P. **Produção *in Vitro* de embriões Bovinos.** *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*. Ano IV, n. 11. São Paulo. 2008.

Bravo, L. **Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance.** *Nutr Rev* 56(11): 317-333. 1998.

Caixeta, E. S. e Dode, M. A. N. **Avaliações da competência ovocitária em bovinos.** *Vet e Zootec*. Pág 8-18. 2010.

Correa, G. A., Rumpf, T. C. Mundim, M. M. Franco and M. A. Dode. **Oxygen tension during *in vitro* culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress.** *Anim Reprod Sci* 104(2-4): 132-142. 2008.

Crocomo, L., Filho, W. C. M., Landim-Alvarenga, F. C., Bicudo, S. D. **Produção de embriões *in vitro*: estresse oxidativo e antioxidantes.** *Veterinária e Zootecnia*, v. 19, n.4, p.470-479. 2012.

Deleuze, S.; Goudet, G. **Cysteamine supplementation of *in vitro* maturation media: a review.** *Reprod. Dom. Anim.*, v.45, p.476-482, 2010.

de Matos, D. G., C. Herrera, R. Cortvrindt, J. Smits, A. Van Soom, D. Nogueira and R. S. Pasqualini. **Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation and embryo culture: a useful tool for increasing the efficiency of bovine *in vitro* embryo production.** *Mol Reprod Dev* 62(2): 203-209. 2022.

De Souza, N. S., Abade, C. C. **Produção in vitro de embriões bovinos: etapas de produção e histórico no Brasil.** Ciência Veterinária UniFil, v. 1, n. 3, jul./set. 2018.

Dode, M. A. N.; CARVALHO, J. O. **Métodos para determinar a qualidade de embriões produzidos in vitro.** Spermova; 4(2): 120 – 130. 2014.

Dunning, K. R.; Akison, L. K.; Russel, D. L.; Norman, R. J.; Robker, R. L. **Increased beta-oxidation and improved oocyte developmental v competence in response to L-carnitine during ovarian in vitro v follicle development in mice.** Biology Reproduction. v.85, p. 548-555. 2011.

Fair, T. **Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence.** Animal Reproduction Science, v. 78, p. 203-216, 2003.

Ferreira, A. L. A., Matsubara, L. S. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo.** Rev Assoc Med Bras.43:1-16. 1997.

Ferreira, A. R. Franco, M. M. **Reprogramação epigenética em gametas e embriões de mamíferos.** Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.36, n.1, p.3-9, jan./mar. 2012.

Ferreira, E. M.; Vireque, A. A.; Adona, P. R.; Meirelles F. V.; Ferriani, R. A.; Navarro, P. A. A. S. **Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence.** Theriogenology, v. 71, p. 836-848, 2009.

Fidelis, A. A. G.; Leme, L. O.; Ramiro Jr. E.; Leme, A.; Rumpf, R.; Franco, M. M. **Antioxidantes associados à pressão hidrostática sobre a viabilidade embrionária pós desvitrificação.** Revista Brasileira de Reprodução Animal. 2014.

Fidelis, A. A. G.; de Oliveira Fernandes, G.; Melo, F. R.; Leme, L. de O.; Adona, P. R.; Kawamoto, T. S.; Dode, M. A. N. **Ethanollic Extract of Dried Leaves from the Cerrado Biome Increases the Cryotolerance of Bovine Embryos Produced In Vitro.** Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 1–16. 2020.

Garcia, J. M., Avelino, K. B., Vantini, R. **Estado da arte da fertilização in vitro em bovinos. Em: I Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada.** Londrina, PR. Anais. SIRAA: Londrina, p.223-230. 2004.

Gonçalves, P. B. D., De Figueiredo, J. R., Freitas, V. J. F. (ed.). **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal.** ROCCA. ISBN 8572417443. 2008.

Gottardi, F. P., Mingoti, G. Z. **Maturação de ovócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião.** Revista Brasileira Reprodução Animal, Belo Horizonte, v.33, n.2, p.82-94, abr./jun. 2009.

Gouveia, F. F. **A produção in vitro de embriões Bovinos. (Bovine embryo in vitro Production).** 35p. Monografia. (Conclusão do curso de Medicina Veterinária) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF. 2011.

Guerin, P.; Guillaud, J.; Menezes, Y. **Hypotaourine in spermatozoa and genital secretions and its production by oviduct epithelial cells in vitro.** Hum Reprod 10(4): 866-872. 1995.

- Guimaraes, A. L., S. A. Pereira, N. R. Kussano and M. A. Dode. **The effect of prematuration culture using phosphodiesterase type 3 inhibitor and insulin, transferrin and selenium on nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes.** *Zygote* 24(2): 219-229. 2016.
- Gutteridge, J. M. and Halliwell, B. **Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future.** *Ann N Y Acad Sci* 899: 136-147. 2000.
- Hashimoto, S.; Minami, N.; Takakura, R. et al. **Low oxygen tension during *in vitro* maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus-oocyte complexes.** *Mol. Reprod. Dev.* V. 57, p. – 353-360, 2000.
- Hosaka, S., Obuki, M., Nkajima, J. Suzuki, M. **Comparative study of antioxidants as quenchers or scavengers of reactive oxygen species based on quenching of MCLA-dependent chemiluminescence.** Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Tokyo Polytechnic University, 1583 Atsugi, Kanagawa 243-0297, Japan, 2005.
- Kitagawa, Y.; Suzukib, K.; Yonedaa, A.; Watanabea, T. **Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation on porcine embryos.** *Theriogenology.*, v.62, p.1186-1283, 2004.
- Krisher, R. L. **The effect of oocyte quality on development.** *Journal Animal Science*, v. 82, p. 14-23, 2004.
- Leite, H. P.; Sarni, R. S. **Radicais livres, antioxidantes e nutrição.** *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*, v. 18, n. 2, p. 87-94, 2003.
- Leopoldini, M. R., N.; Toscano, M. **The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants.** *Food Chemistry* 125: 19. 2011.
- 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.
- Lonergan, P., Fair, T. ***In vitro*-produced bovine embryos: Dealing with the warts.** *Theriogenology*, v.69, p.17-22, 2008.
- Lott, W. M.; Anchamparathy, V. M.; McGilliard, M. L.; Mullarky, I. K.; Gwazdauskas, F. C. **Influence of cysteine in conjunction with growth factors on the development o *in vitro*-produced bovine embryos.** *Reprod. Dom. Anim.*, v.46, p.585- 594, 2010.
- Luberda, Z. **The role of glutathione in mammalian gametes.** *Reproductive biology* 5(1): 5-17. 2005.
- Manjunatha BM, Devaraj M, Gupta PS, Ravindra JP, Nandi S. **Effect of taurine and melatonin in the culture medium on buffalo *in vitro* embryo development.** *Reprod Domest Anim.* 2009.

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

Menezo, Y. J., E. Silvestris, B. Dale and K. Elder. **Oxidative stress and alterations in DNA methylation: two sides of the same coin in reproduction**. *Reprod Biomed Online*. 2016

Mello, R. R. C., J. E. Ferreira, S. L. G. de Sousa, M. R. B. de Mello, H. B. Palhano. **Produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos**. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.40, n.2, p.58-64, abr./jun. 2016.

Mishra, A., I. J. Reddy, P. S. Gupta and S. Mondal. **L-carnitine Mediated Reduction in Oxidative Stress and Alteration in Transcript Level of Antioxidant Enzymes in Sheep Embryos Produced *In Vitro***. *Reprod Domest Anim* 51(2): 311-321. 2016.

Morales, H., Tilquin, P., Rees, J. F., Massip, A., Dessy, F., Van Langendonck, A. **Pyruvate prevents peroxide-induced injury of *in vitro* preimplantation bovine embryos**. *Molecular Reproduction and Development*. V. 52, n.2, p.149-157. 1999.

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

Nogueira, C. M. **Investigação do efeito da atmosfera gasosa na maturação e fecundação *in vitro* sobre o metabolismo celular e epigenético de embriões bovinos**. Dissertação (mestrado). 70p. São Paulo: Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2019.

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

Oliveira, C. S.; Sarapião, R. V.; Quintão, C. C. R. **Biotécnicas da Reprodução em Bovinos**. Documentos 175. Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. 2014.

Peleg, H.; Bodine, K. K.; Noble, A. C. **The influence of acid on adstringency of alum and phenolic compounds**. *Chemical Senses*, Oxford, v.23, n.3, p.371-378, 1998.

Reece, W. O. **Anatomia funcional e fisiologia dos animais domésticos**. 3. Ed. São Paulo: ROCCA, 2008.

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.

Rocha-Frigoni, N. A.; Leão, B. C.; Nogueira, É.; Mingoti, G. Z. **Effect of gaseous atmosphere and antioxidants on the development and cryotolerance of bovine embryos at different periods of *in vitro* culture**. *Zygote*, v.23, p.159-168, 2015.

Rodrigues-Cunha, M. C., L. G. Mesquita, F. Bressan, M. D. Collado, J. C. Balieiro, K. R. Schwarz, F. C. de Castro, O. Y. Watanabe, Y. F. Watanabe, L. de Alencar Coelho and C. L. Leal. **Effects of melatonin during IVM in defined medium on oocyte meiosis, oxidative stress, and subsequent embryo development**. *Theriogenology* 86(7): 1685-1694. 2016.

Sartori, R., Dode, M. A. N., Rumpf, R. **Produção *in vivo* e *in vitro* de embriões bovinos. Em: Bovinocultura de corte.** Alxexandre Vaz Pires. (Org.). 1^oed. Piracicaba: Fealq, 2010, v.1, p. 561-584.

Sies, H. **Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress.** Redox Biol v.11: p.613-619, 2017.

Silva, C. M. G., Fautino, L. R., Saraiva, M. V. A., Rossetto, R., Figueiredo, J. R. **Influência da tensão de oxigênio na maturação oócitaria e cultivo *in vitro* de folículos e embriões.** Revista Brasileira Reprodução Animal, Belo Horizonte – MG, v.34, n.4m p.233-242, 2010.

Smith, G. D., A. Monteiro da Rocha. **Advances in embryo culture systems.** Semin Reprod Med. 2012.

Somfai, T.; Bodo, S.; Nagy, S.; Papp, A. B.; Ivancsics, J.; Baranyai, B. **Effect of swim up and Percoll treatment on viability and acrosome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa.** Reprod Domest Anim 37:285-90. 2002.

Takao, L. K., M. Imatomi and S. C. Gualtieri (2015). **Antioxidant activity and phenolic content of leaf infusions of Myrtaceae species from Cerrado (Brazilian Savanna).** Braz. J. Biol. vol. 75, no. 4, pp. 948-952. 2015.

Thompson, J. G. E.; Simpson, A. C.; Pugh, P. A.; Donnelly, P. E.; Tervit, H. R. **Effect of oxygen concentration on in-vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos.** J. Reprod. Fertil. 89, 573–8. 1990.

Thompson, J. G. ***In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos - a decade of achievement.** Anim. Reprod. Sci, v.60-61, p.263-275, 2000.

Tian, X.; Wang, F.; He, C.; Zhang, L.; Tan, D.; Reiter, R. J. **Beneficial effects of melatonin on bovine oocytes maturation: a mechanistic approach.** J Pineal Res. 2014.

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.

Varago, F. C., Mendonça, L. F., Lagares, M. A. **Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução.** Revista Brasileira de reprodução animal, Belo Horizonte, v.32 n.2, p100-109, abr/jun 2008.

Viana, J. H. M., Figueiredo, A. C. S, Gonçalves, R. L. R, Siqueira, L. G. B (2018). **A historical perspective of embryo-related technologies in South America.** Proceedings of the 10th International Ruminant Reproduction Symposium; Foz do Iguaçu, PR, Brazil, September 16th to 20th, 2018.

Wang, Z.; Fu, C.; Yu, S. **Green tea polyphenols added to IVM and IVC media affect transcript abundance, apoptosis, and pregnancy rates in bovine embryos.** Theriogenology 79(1): 186-192. 2013.

Wang, F.; Tian, X.; Zhou, Y.; Tan, D.; Zhu, S.; Dai, Y. **Melatonin improves the quality of in vitro produced (IVP) bovine embryos: implications for blastocyst development, cryotolerance, and modifications of relevant gene expression.** PLoS One. 2014.

Yuan, Y. Q.; Van Soom, A.; Coopman, F. O. J.; Mintiens, K.; Boerjan, M. L.; Van Zeveren, A.; de Kruif, A. Peelman, L. J. **Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured *in vitro*.** Theriogenology 59, 1585–96. 2003.

Zhang, K.; Ealy, D. **Disruption of fibroblast growth factor receptor signaling in bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation reduces subsequent embryonic development.** Domestic animal endocrinology, v. 42, n. 4, p. 230–8, 2012.