

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**VIABILIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS
IN VITRO TRANSPORTADOS POR DIFERENTES
TEMPOS EM MEIO DE MANUTENÇÃO COM
ANTIOXIDANTES**

Autora: Mariana da Mata Silveira
Orientadora: Dra. Karen Martins Leão

RIO VERDE – GO
abril - 2019

**VIABILIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS
IN VITRO TRANSPORTADOS POR DIFERENTES
TEMPOS EM MEIO DE MANUTENÇÃO COM
ANTIOXIDANTES**

Autora: Mariana da Mata Silveira
Orientadora: Dra. Karen Martins Leão

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde – Área de concentração Melhoramento e Reprodução Animal.

RIO VERDE – GO
abril – 2019

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

S587v Silveira, Mariana da Mata
Viabilidade de embriões bovinos produzidos in vitro transportados por diferentes tempos em meio de manutenção com antioxidantes / Mariana da Mata Silveira; orientadora Karen Martins Leão. -- Rio Verde, 2019.
60 p.

Dissertação (Mestrado em Zootecnia) -- Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, 2019.

1. desenvolvimento embrionário. 2. fertilização in vitro. 3. melatonina. 4. resveratrol. 5. transporte embrionário. I. Leão, Karen Martins, orient. II. Título.

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**VIABILIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS
IN VITRO TRANSPORTADOS POR DIFERENTES
TEMPOS EM MEIO DE MANUTENÇÃO COM
ANTIOXIDANTES**

Autora: Mariana da Mata Silveira
Orientadora: Karen Martins Leão

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia – Área de concentração Zootecnia
– Zootecnia e Recursos Pesqueiros.

APROVADA em 25 de abril de 2019.



Prof. Dr. Elis Aparecido Bento
Avaliador externo
IF Goiano/ RV



Prof. Dr. Tiago do Prado Paim
Avaliador interno
IF Goiano/ IPORÁ



Prof.ª Dra. Karen Martins Leão
Presidente da banca
IF Goiano/RV



Prof. Dr. Marco Antônio Pereira da Silva
Avaliador interno
IF Goiano/ RV

“Você não consegue ligar os pontos olhando pra frente; você só consegue ligá-los olhando pra trás. Então você tem que confiar que os pontos se ligarão algum dia no futuro. Você tem que confiar em algo – seu instinto, destino, vida, carma, o que for. Esta abordagem nunca me desapontou, e fez toda diferença na minha vida.”

(Steve Jobs)

AGRADECIMENTOS

Mais uma etapa chega ao fim, com ela muito aprendizado e recordações de momentos inesquecíveis se misturam aos novos medos e incertezas.

Agradeço a Deus, por me guiar ao longo dessa caminhada e sempre me dar forças para lutar.

Aos meus pais José Augusto Coelho da Silveira e Diana Simone da Mata Silveira, por todo apoio e amor incondicional, sem os quais eu não teria chegado até aqui.

À minha irmã Maysa da Mata Silveira, pelo incentivo e ao meu irmão Gustavo Augusto da Mata Silveira, pela amizade e companheirismo, sempre ao meu lado me dando suporte.

Ao meu namorado Luis Gustavo dos Santos Cerqueira, pelo amor, paciência, estímulo e ajuda nos momentos de desespero. Hoje sei como tenho sorte em lhe ter ao meu lado.

Aos meus avós, tios e primos, pela acolhida carinhosa em meus regressos para casa.

Aos meus amigos, Camila Destro Ribeiro Novaes e Igor Novaes Pires, por serem minha família em Rio Verde, ao Dheyne Alves Vieira, por sempre estar comigo em qualquer situação, ao João Antônio Gonçalves e Silva, por me transmitir paz simplesmente pela sua presença, ao Mário Lima (*in memoriam*) e Fagner Machado Ribeiro, pela receptividade e auxílio no período inicial do curso. E, embora nos distanciemos ao final desse ciclo, vão sempre estar guardados nas minhas lembranças, pelos seres especiais que são e pelos momentos inesquecíveis que me proporcionaram.

À minha orientadora Karen Martins Leão, que se tornou mais que uma orientadora, uma amiga, agradeço pela oportunidade, ensinamentos, conselhos, ajudas nas diversas situações e acolhida. Não cabem palavras para minha gratidão.

Ao meu coorientador Marco Antônio Pereira da Silva, por me agregar aos seu orientados e sempre se dispor a me ajudar me conquistando a cada dia com seu enorme coração.

À Thaisa Campos Marques, por toda ajuda com o projeto.

Aos professores Tiago Pereira Guimarães e Fabiana Ramos dos Santos, pelo exemplo e dedicação.

Aos funcionários José Cícero da Silva e Viviane Proto, pela convivência e importantes colaborações.

Ao Laboratório de Reprodução Animal, por todo conhecimento e experiência adquiridos, fundamentais para minha formação profissional e pessoal. Em especial, agradeço ao Viler Carrijo Oliveira e Nivaldo Ribeiro de Almeida Neto, que participaram do projeto como alunos de iniciação científica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro desse projeto através do edital 21/2015.

Enfim, a todas as pessoas especiais que fizeram e fazem parte desse ciclo e da minha vida, muito obrigada!

BIOGRAFIA DA AUTORA

MARIANA DA MATA SILVEIRA, filha de José Augusto Coelho da Silveira e Diana Simone da Mata Silveira, nasceu no município de São Tiago – MG, no dia 17 de abril de 1989. Ingressou no curso de Bacharelado em Medicina Veterinária em 2010, pela Universidade Federal de Lavras, no município de Lavras – MG. Durante a graduação atuou como bolsista PIVIC/UFLA e PIBIC/CNPq na área de nutrição de bovinos leiteiros sob orientação do Prof. Dr. Marcos Neves Pereira e na área de microbiologia agrícola sob orientação do Prof. Dr. José Cardoso Pinto. Participou dos núcleos de estudo, Grupo do Leite e Reproduz. Foi mentora bolsista do programa de mentoria para calouros por dois anos e realizou seu estágio supervisionado na empresa Reproduza Biotecnologia, apresentando seu trabalho de conclusão de curso sob orientação do Prof. Dr. Flamarion Tenório de Albuquerque. No primeiro semestre de 2017 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia no Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, em nível de Mestrado, na área de concentração Melhoramento e Reprodução Animal sob orientação da Prof.^a Dra. Karen Martins Leão. Em abril de 2019 submeteu a banca avaliadora sua dissertação, intitulada: Viabilidade de embriões bovinos produzidos *in vitro* transportados a 36°C em meio de manutenção enriquecido com antioxidantes.

ÍNDICE GERAL

| | Página |
|--|--------|
| ÍNDICE DE TABELAS | xi |
| ÍNDICE DE FIGURAS | xii |
| LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES | xiii |
| CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS | 1 |
| INTRODUÇÃO GERAL | 1 |
| 1. REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| 1.1. Produção <i>In Vitro</i> de Embriões | 3 |
| 1.2. Desenvolvimento e transferência embrionária..... | 5 |
| 1.3. Fatores que influenciam a produção <i>in vitro</i> de embriões..... | 7 |
| 1.4. Antioxidantes | 9 |
| 1.4.1. Melatonina | 10 |
| 1.4.2. Resveratrol..... | 11 |
| 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 13 |
| CAPÍTULO 2 - ARTIGO CIENTÍFICO..... | 20 |
| Resumo | 21 |
| Abstract..... | 22 |
| Resumen | 23 |
| Introdução | 24 |
| Materiais e Métodos | 25 |
| <i>Local de estudo e meios utilizados.....</i> | 25 |
| <i>Preparo das soluções estoque dos antioxidantes</i> | 26 |
| <i>Produção in vitro de embriões</i> | 27 |
| <i>Obtenção de oócitos.....</i> | 27 |
| <i>Maturação in vitro</i> | 27 |
| <i>Fertilização in vitro</i> | 27 |
| <i>Cultivo in vitro.....</i> | 28 |
| <i>Adição de antioxidantes ao meio de manutenção, envase e simulação de transporte .</i> | 28 |
| <i>Desenvase, recultivo e avaliações</i> | 29 |

| | |
|--|----|
| <i>Delineamento Experimental e análises estatísticas</i> | 29 |
| Resultados | 30 |
| Discussão | 37 |
| Referências | 41 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | Página |
|--|--------|
| Tabela 1 - Percentual de embriões que mantiveram o estágio de desenvolvimento (MANT), desenvolveram (DES) e degeneraram (DEG) em função dos tratamentos controle, resveratrol e melatonina em três tempos de simulação de transporte, avaliados no momento do desenvase. | 31 |
| Tabela 2 – Percentual de embriões que mantiveram o estágio de desenvolvimento (MANT), desenvolveram (DES) e degeneraram (DEG) em função dos tratamentos controle, resveratrol e melatonina em três tempos de simulação de transporte, avaliados 24 horas após o envase. | 31 |
| Tabela 3 – Percentual de embriões que mantiveram o estágio de desenvolvimento (MANT), desenvolveram (DES) e degeneraram (DEG) em função dos tratamentos controle, resveratrol e melatonina em três tempos de simulação de transporte, avaliados 48 horas após o envase. | 32 |
| Tabela 4 – Percentual de embriões que mantiveram o estágio de desenvolvimento (MANT), desenvolveram (DES) e degeneraram (DEG) em função dos tratamentos controle, resveratrol e melatonina em três tempos de simulação de transporte, avaliados 72 horas após o envase. | 33 |
| Tabela 5 – Percentual de embriões que eclodiram em função dos tratamentos controle, resveratrol e melatonina em três tempos de simulação de transporte, avaliados no momento do desenvase, 24, 48 e 72 horas após o envase. | 33 |
| Tabela 6 – Valores de p-valor para os efeitos do modelo, considerando avaliação multinomial do desenvolvimento do embrião no momento do desenvase, 24 horas, 48 horas e 72 horas após o envase no recultivo. | 33 |
| Tabela 7 – Valores de p-valor para os efeitos do modelo, considerando avaliação multinomial da qualidade dos embriões no momento do desenvase, 24 horas, 48 horas e 72 horas após o envase. | 35 |
| Tabela 8 – Percentual de embriões que eclodiram (ECLO) e degeneraram (DEG) em função do estágio de desenvolvimento no momento do envase (Bi, B1 e Bx) e do tempo de simulação de transporte (6, 9 e 12 horas), avaliados 48 e 72 horas após o envase. ... | 37 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Página |
|--|--------|
| Figura 1. Período de recultivo dos embriões após o desenvase de cada tratamento..... | 29 |
| Figura 2. Definição dos tratamentos após a produção <i>in vitro</i> de embriões..... | 30 |
| Figura 3. Probabilidade para os diferentes estágios de desenvolvimento considerando meio de manutenção (Controle, Melatonina e Resveratrol) e tempo de simulação de transporte (3, 6 e 12 horas), assumindo análise ordinal dos dados. | 34 |
| Figura 4. Probabilidade dos scores de qualidade dos embriões considerando meio de manutenção (Controle, Melatonina e Resveratrol) e tempo de simulação de transporte (6, 9 e 12 horas), assumindo análise ordinal dos dados..... | 36 |

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

| | |
|-------------------------------|--|
| % | Porcentagem |
| (v/v) | Volume por volume |
| < | Menor |
| > | Maior |
| AGRODEFESA | Agência Goiana de Defesa Agropecuária |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| Bi | Blastocisto Inicial |
| B1 | Blastocisto |
| BSA | Albumina sérica bovina |
| Bx | Blastocisto Expandido |
| CCO | Complexo <i>cumulus-oócito</i> |
| CIV | Cultivo <i>in vitro</i> |
| CO ₂ | Dióxido de Carbono |
| COOPERCARNE | Cooperativa dos Comerciantes de Carne do Estado de Goiás |
| D0 | Dia zero |
| D3 | Terceiro dia |
| D7 | Sétimo dia |
| DEG | Embriões que degeneraram |
| DES | Embriões que desenvolveram o estágio de desenvolvimento |
| DIC | Delineamento Inteiramente Casualizado |
| ECLD | Embriões que eclodiram |
| EROS | Espécies Reativas de Oxigênio |
| FIV | Fertilização <i>in vitro</i> |
| FSHr | Receptor do Hormônio Folículos Estimulante |
| g | Gramas |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de Hidrogênio |
| IETS | Sociedade Internacional de Transferência de Embriões |
| M | Molar |
| MANT | Embriões que mantiveram o estágio de desenvolvimento |
| mg | Miligrama |

| | |
|-----------------------------|--------------------------------------|
| MIV | Maturação <i>in vitro</i> |
| mL | Militro |
| mM | Milimolar |
| O ₂ | Oxigênio |
| O ₂ ⁻ | Superóxido |
| °C | Graus Celsius |
| OH | Hidroxila |
| OPU | Ovum Pick Up |
| PIVE | Produção <i>In Vitro</i> de Embriões |
| rpm | Rotação por minuto |
| SFB | Soro Fetal Bovino |
| SIE | Serviço de Inspeção Estadual |
| SOF | <i>Synthetic Oviductal Fluid</i> |
| TALP | Tyrode-Albumina-Lactato-Piruvato |
| TCM 199 [®] | Tissue Culture Medium 199 |
| UI | Unidade Internacional |
| x g | Força G |
| µg | Micrograma |
| µL | Microlitro |
| µM | Micromolar |

RESUMO

O uso de antioxidantes como a melatonina e o resveratrol tem demonstrado efeitos benéficos na produção *in vitro* de embriões, reduzindo as espécies reativas de oxigênio e melhorando a qualidade e desenvolvimento embrionário. Com isso, objetivou-se avaliar o efeito da adição dos antioxidantes resveratrol e melatonina ao meio de manutenção sobre a viabilidade de embriões bovinos produzidos *in vitro*, mantidos a 36°C em diferentes tempos de simulação de transporte. No sétimo dia (D7) de cultivo *in vitro*, os embriões grau I e II em estágio de blastocisto inicial (Bi), blastocisto (Bl) e blastocisto expandido (Bx) foram selecionados e distribuídos aleatoriamente em três condições de manutenção: controle (meio de manutenção), melatonina (meio de manutenção + melatonina a 10^{-9} M) e resveratrol (meio de manutenção + resveratrol a $0,5\mu$ M). Para simular o transporte, as palhetas com os embriões foram colocadas em transportadora de embriões na temperatura de 36°C e mantidas por 6, 9 e 12 horas. Transcorrido o tempo determinado conforme o tratamento, os embriões foram desenvasados e recultivados em meio de cultivo por 72 horas para avaliação da qualidade e desenvolvimento embrionário. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com arranjo fatorial 3x3. As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa computacional R Project versão 3.5.0 com nível de significância de 5% de probabilidade. Em primeiro momento foram realizadas análises por dados multinomiais ordinais, para avaliação dos tratamentos em arranjo fatorial. Em um segundo processo foram considerados nove tratamentos para a avaliação isolada, realizando testes de qui-quadrado. Com 72 horas de recultivo não se observou diferença entre os tratamentos no percentual de embriões que desenvolveram, degeneraram e eclodiram. O desenvolvimento e qualidade embrionária não sofreram efeito do meio e do tempo de simulação de transporte. Embriões envasados no estágio de Bx apresentaram maiores taxas de eclosão e menores taxas de degeneração. Conclui-se que é viável o transporte de embriões bovinos, frescos, produzidos *in vitro*, em meio de manutenção sem suplementação dos antioxidantes estudados por 12 horas em transportadora a 36°C. Embriões envasados no estágio Bx, independentemente do tempo de simulação de transporte, apresentaram maior viabilidade.

Palavras-chave: *Bos taurus*, desenvolvimento embrionário, fertilização *in vitro*, melatonina, resveratrol, transporte embrionário.

ABSTRACT

The antioxidants use such as melatonin and resveratrol has shown beneficial effects in the embryos *in vitro* production, reducing reactive oxygen species and improving embryo quality and development. The objective of this study was to evaluate the addition effect of the antioxidants resveratrol and melatonin to the maintenance medium on the viability of bovine embryos produced *in vitro*, maintained at 36°C in different transport simulation times. On the seventh day (D7) of *in vitro* culture, embryos of stage I and II in the initial blastocyst stage (B1), blastocyst (B1) and expanded blastocyst (B1) were randomly assigned to three maintenance conditions: control medium (maintenance medium + 10⁻⁹M melatonin) and resveratrol (maintenance medium + 0.5µM resveratrol). To simulate the transport, the embryo vanes were placed in embryo carrier at a temperature of 36°C and maintained for 6, 9 and 12 hours. After the time determined according to the treatment, the embryos were removed and regrowth in culture medium for 72 hours for quality evaluation and embryonic development. The experiment was carried out in a completely randomized design with factorial arrangement 3x3. Statistical analyzes were performed using the R Project software version 3.5.0 with a significance level of 5% probability. Initially analyzes were carried out by ordinal multinomial data, to evaluate the treatments in a factorial arrangement. In a second process, nine treatments were considered for the isolated evaluation, performing chi-square tests. With 72 hours of regrowth, no difference was observed between treatments in the embryos percentage that developed, degenerated and hatched. The development and embryonic quality were not affected by the mean and time of transport simulation. Embryos packed in the Bx stage showed higher hatch rates and lower degeneration rates. It is concluded that it is feasible to transport fresh bovine embryos, produced *in vitro*, in maintenance medium without supplementation of the studied antioxidants for 12 hours in carrier at 36°C. Embryos packed in stage Bx, regardless of transport simulation time, showed greater viability.

Keywords: Bos Taurus, embryonic development, *in vitro* fertilization, melatonin, resveratrol, embryonic transport.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

INTRODUÇÃO GERAL

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem sido utilizada em escala comercial e científica (Andrade et al., 2012), sendo importante instrumento na exploração do potencial reprodutivo dos rebanhos bovinos (Varago et al., 2008). Com a técnica bem padronizada em suas diferentes etapas, o Brasil ocupa lugar de destaque no cenário mundial, com produção de 345.528 embriões bovinos produzidos *in vitro* no ano de 2017 (Viana, 2018).

A biotécnica permite a utilização de fêmeas bem jovens, a partir dos seis meses de idade, gestantes no primeiro terço de gestação e fêmeas de alto valor genético que não estão mais aptas a produzirem descendentes pelos métodos convencionais, além de possibilitar o aumento do número de embriões produzidos em menor tempo e melhorar a viabilidade da utilização do sêmen sexado (Bueno e Beltran, 2008).

Entretanto, os embriões produzidos *in vitro* possuem baixo índice de desenvolvimento até o estágio de blastocisto, menor resistência as técnicas de criopreservação, maiores perdas embrionárias e fetais após transferência (Van Wagtendonk-de Leeuw, 2005).

Fatores como o maior acúmulo de lipídeos (Mata-Campuzano et al., 2012) e as altas concentrações de oxigênio durante o sistema de produção (Agarwal et al., 2006) estão associadas com a maior sensibilidade do embrião *in vitro* ao estresse oxidativo (Ambruosi et al., 2009).

O acúmulo de lipídeos no citoplasma de embriões *in vitro* provoca baixa criotolerância (Mucci et al., 2006) e maior sensibilidade ao estresse oxidativo (Ambruosi et al., 2009). Porém, também apresenta importante papel fisiológico, como potenciais reservatórios de energia para o desenvolvimento embrionário (Sturmey et al., 2009).

O soro fetal bovino (SFB) adicionado aos meios de cultura da produção *in vitro* promove aumento nas taxas de clivagem e blastocistos produzidos (Leivas et al., 2011), porém, pode causar prejuízos na qualidade dos embriões (Garcia et al., 2015), por induzir maior acúmulo de lipídeos intracelular (Pereira e Marques, 2008).

O estresse oxidativo é consequência de um desequilíbrio na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e/ou redução de agentes antioxidantes (Gupta et al., 2010) e provoca efeitos deletérios sobre as funções celulares (Agarwal et al., 2005).

As EROS são metabólitos de oxigênio (O_2), seu benefício ou malefício são dependentes das concentrações encontradas. Sendo que, em baixas concentrações, possuem importante desempenho em processos fisiológicos. Porém, quando em altas concentrações possuem efeitos deletérios, danificando moléculas e estruturas celulares, levando a morte da célula (Hosseini et al., 2009).

Outro viés encontrado na PIVE, são as longas distâncias do território brasileiro, desde os centros laboratoriais de produção dos embriões até as propriedades rurais, que são destinados os embriões. Sabe-se que, o tempo gasto no transporte pode interferir diretamente na viabilidade dos embriões, e conseqüentemente, nas taxas de gestação. Portanto, o transporte do embrião fresco deve ocorrer em meio de manutenção que permita o desenvolvimento e em menor período possível, evitando o estresse oxidativo (Marinho et al., 2012).

Com o intuito, de reduzir o estresse oxidativo e melhorar a qualidade e viabilidade dos embriões produzidos *in vitro*, a adição de antioxidantes como a melatonina e o resveratrol aos meios de maturação (Lee et al., 2018), cultivo (Wang et al., 2014; Marques et al., 2018) e criopreservação (Wang et al., 2018) tem sido sugerida.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Produção *In Vitro* de Embriões

A PIVE permite formação de novo indivíduo por meio da penetração do espermatozoide no oócito fora do trato reprodutivo da fêmea. Envolvendo etapas de coleta e maturação *in vitro* (MIV) de oócitos, fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) de zigotos e estruturas embrionárias (Gonçalves et al., 2001).

A técnica pode proporcionar diversos ganhos, como determinação do sexo dos embriões, aumento da eficiência dos programas de reprodução, avaliação do efeito materno sobre a descendência, facilidade de importação e exportação de material genético da fêmea, formação de bancos de gametas congelados, aumento da eficiência do sêmen congelado de alto valor genético e o estudo e desenvolvimento de outras biotécnicas reprodutivas a partir da micromanipulação de gametas e embriões (Gonçalves et al., 2008).

A coleta de oócitos pode ser realizada por método *post mortem*, a partir da punção de ovários de abatedouro ou vacas de alto valor genético que venham a óbito, e *in vivo* por meio de laparotomia via flanco, laparoscopia vaginal (Mello et al., 2016a) e aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom – *Ovum Pick Up* (OPU) (Varago et al., 2008). A OPU é o método de eleição para obtenção de oócitos *in vivo* em bovinos, devido ao processo menos invasivo e mais flexível (Gonçalves et al., 2007).

Após retirada dos oócitos dos folículos ovarianos, estes ainda não se encontram aptos para fertilização e desenvolvimento embrionário inicial, sendo necessário passarem por uma série de modificações estruturais e bioquímicas no núcleo e citoplasma para adquirirem a maturação oócitaria (Galli et al., 2003). A inadequada maturação inviabiliza a fecundação, aumentando a ocorrência de polispermia e bloqueio de desenvolvimento embrionário (Mingoti, 2005), por isso, o tempo mais indicado para o processo de MIV é de 24 horas. Estudos, porém, observaram desempenho embrionário semelhante em processos de maturação de 18 horas (Varago et al., 2008).

Quanto aos sistemas de MIV, diferentes meios e protocolos vêm sendo estudados, sendo o meio mais difundido o Tissue Culture Medium 199 (TCM 199[®]) (Gonçalves et al., 2001), geralmente suplementado com lactato, piruvato, bicarbonato de sódio, aminoácidos, vitaminas, antibióticos e hormônios (Gandhi et al., 2000), incubado em

estufa com atmosfera gasosa controlada contendo 5% de CO₂ em ar e umidade saturada e temperatura de 39° C (Gonçalves et al., 2007).

A fecundação é o processo em que o espermatozoide entra em contato com o oócito, gerando o zigoto. No processo *in vivo*, é necessário que os espermatozoides cheguem até a ampola da tuba uterina para fecundar o oócito, e ao longo do trajeto, substâncias presentes no sistema reprodutor da fêmea induzem a capacitação dos espermatozoides, provocando alterações bioquímicas, tais como mudanças na fluidez e no teor lipídico da membrana plasmática, resultando na hiperativação espermática (Mello et al., 2016b).

A capacitação espermática ocorre pela remoção dos fatores incapacitantes presentes no plasma seminal. Neste processo, as principais alterações são bioquímicas e incluem a remoção do colesterol, e eleva a fluidez da membrana espermática, entrada de cálcio intracelular, aumento da concentração de adenosina 3'5'-monofosfato cíclico e alterações de atividades enzimáticas, tal como da proteína quinase C envolvida no mecanismo de transdução de sinais que irão desencadear a reação acrossômica (Varago et al., 2008).

Para que o processo de fertilização *in vitro* ocorra com êxito, faz-se necessário a maturação completa dos oócitos, assim como a correta preparação dos espermatozoides e um ambiente apropriado para os mesmos (Martins, 2014). Neste processo, os meios e protocolos usados devem fornecer ambiente adequado, permitindo o metabolismo do complexo *cumulus-oócito* (CCO) e manutenção da função espermática eficiente para que ocorra a fertilização (Gonçalves et al., 2007).

Dentre vários meios testados, o mais utilizado é o Tyrode-Albumina-Lactato-Piruvato (TALP) como foi originalmente descrito por Bavister e Yanagimachi em 1977, contendo adição de heparina, agente de capacitação espermática. O tempo de incubação da FIV pode variar de seis a 24 horas, dependendo do protocolo utilizado, sendo mantido em estufa com mesma atmosfera gasosa e temperatura que o processo de MIV que o antecede (Mingoti, 2005).

Para FIV em bovinos, a maioria dos laboratórios faz uso de sêmen congelado. Entretanto, após o descongelamento, é imprescindível selecionar os espermatozoides viáveis dos inviáveis (Varago et al., 2008). Esta seleção é realizada na maioria das vezes pela separação em gradiente de Percoll, embora outros sistemas possam ser utilizados como o swim-up ou o lavado espermático. O percoll é composto por partículas de sílica coloidal coberto com polivinilpirrolidona, preparado em diferentes concentrações para

formar um gradiente descontínuo de duas ou três fases (90, 45 e 30%) para separação espermática (Gonçalves et al., 2008).

Nesta seleção por Percoll grande parte dos espermatozoides defeituosos são eliminados e apenas os que apresentam boa motilidade são selecionados. Isto porque as alterações de cromatina estão normalmente associadas a alterações morfológicas, e consequentemente, de motilidade (Enciso et al., 2011).

Passada as etapas de MIV e FIV, o zigoto formado passará por inúmeras divisões celulares para formar-se blastocisto. O cultivo dos embriões é realizado em meios que simulam a condição dos fluidos do útero e tuba uterina durante o início da gestação. Alterações neste ambiente podem comprometer as etapas de clivagem, ativação do genoma embrionário no estágio de oito a 16 células, compactação da mórula e formação de blastocisto entre os dias seis e sete após a FIV (Lonergan et al., 2003).

O meio base de cultivo com melhores resultados de desenvolvimento embrionário é o *Synthetic Oviductal Fluid* (SOF), desenvolvido com base no fluido do oviduto de ovelhas (Varago et al., 2008), podendo conter ou não Soro Fetal Bovino (SFB) (Machaty et al., 2012). Assim como nos demais procedimentos, as condições de temperatura e atmosfera são muito importantes para obtenção de bons índices de produção (Garcia et al., 2008), sendo mantida a temperatura de 39° C e indicada a utilização de baixa tensão de oxigênio (5% de O₂) (Mingoti, 2005).

Embriões *in vitro* se diferem de embriões *in vivo* em características físicas e morfológicas, sendo essas associadas a menor qualidade dos embriões produzidos *in vitro* (Corcoran et al., 2006). Observa-se entre as diferenças, que o embrião *in vitro* possui maior quantidade de vacúolos, reduzida expressão de comunicações celulares, menor número de células totais e tamanho de disco embrionário, compactação menos pronunciada e zona pelúcida mais frágil. Além de maior acúmulo intracelular de lipídeos (Crosier et al., 2001) e diferente expressão de genes importantes para o desenvolvimento (Mundim et al., 2009).

Essas diferenças causam menor taxa de prenhez após transferência a fresco (Pontes et al., 2009) e menor criotolerância do embrião *in vitro*, estando atribuídas as condições de cultivo, estágio de desenvolvimento, qualidade do embrião e método de criopreservação (Sudano et al., 2014).

1.2. Desenvolvimento e transferência embrionária

Após a fertilização, e conseqüentemente, associação dos gametas, ocorre a primeira divisão mitótica, originando os blastômeros (Yanagimachi, 1994). Iniciando o processo conhecido como clivagem, que compreende o intervalo entre a fecundação do oócito e implantação do conceito, com sucessivas divisões mitóticas do zigoto, ativação da transcrição embrionária e eventos morfogênicos de compactação e cavitação, culminando com a formação do blastocisto (Watson et al., 2004).

Até o estágio de oito células, os blastômeros encontram-se arranjados frouxamente, com as divisões bem nítidas. A partir daí, há mudança de comportamento e aglomeração das células de forma compacta, denominando o estágio de mórula (Alves e Cruz, 2002).

A mórula apresenta dois estágios durante o desenvolvimento embrionário. No estágio inicial, os blastômeros ainda são evidentes, mas sem possibilidade de determinação do número exato. A massa de células ocupa maior parte do espaço dentro da zona pelúcida e ocorre o fim da fase de celularização e início do processo de compactação. No segundo estágio, a denominada mórula compacta apresenta a massa de células coesa, dificultando individualização dos blastômeros, causando retração do embrião em relação à zona pelúcida e aumento do espaço perivitelínico. Ocorre a formação de junções de adesão e de oclusão entre as células, preparando para a formação da blastocele (Stringfellow e Seidel, 1998).

Decorrendo o desenvolvimento, os blastômeros criam um gradiente osmótico que atrai água para o espaço intercelular, iniciando a formação de uma cavidade denominada blastocele. Ocorre a formação de duas populações celulares distintas, o trofoblasto e a massa celular interna, caracterizando o estágio de blastocisto inicial. Quando a blastocele aumenta de tamanho, tornando-se proporcionalmente maior que a massa celular interna e ocupando gradualmente todo o espaço perivitelínico caracteriza-se a formação do blastocisto (Ramos et al., 2008).

Finalmente a expansão da blastocele causa aumento de tamanho do embrião e progressiva redução na espessura da zona pelúcida. Há maior desenvolvimento do trofoblasto e da massa celular interna, definindo assim o blastocisto expandido. Com o rompimento da zona pelúcida o embrião entra em contato direto com os tecidos maternos atingindo o estágio classificado como blastocisto eclodido (Gonçalves et al., 2008).

Até o estágio de blastocisto o desenvolvimento é independente da sinalização uterina, viabilizando a produção *in vitro*. Nessa etapa, ocorre a transferência embrionária

para receptoras previamente sincronizadas, geralmente no sétimo dia de cultivo (Sánchez et al., 2018).

Após a eclosão do blastocisto, secreções endometriais promovem alterações morfológicas com alongamento do embrião (Clemente et al., 2009). O grau de alongamento é totalmente dependente de secreções maternas, e está diretamente associado com a capacidade de produção de interferon tau, que é responsável pelo *feedback* para o reconhecimento materno da gestação (Mann e Lamming, 2001).

A comunicação entre o concepto e o endométrio na forma do reconhecimento materno da gestação é fundamental para o estabelecimento da gestação, implantação do blastocisto e placentação (Aheem, 2017). O agente do reconhecimento materno da gestação em ruminantes é o interferon tau, que atua no endométrio prevenindo a luteólise, mantendo o corpo lúteo e conseqüentemente, a produção de progesterona, principal hormônio da gestação (Roberts, 1989).

A falha no reconhecimento materno da gestação decorrente do subdesenvolvimento dos embriões, assincronia útero embrionária e má formação de corpo lúteo das receptoras são eventos complexos que estão associados com as menores taxas de gestação utilizando embriões produzidos *in vitro* (Haas et al., 2007).

Sabe-se que inúmeros fatores influenciam no processo entre a implantação do embrião e estabelecimento da gestação, entre esses, a idade da receptora, o grau de assincronia embrião-receptora, a reutilização de receptoras, a localização, o número e tamanho dos corpos lúteos, o estado nutricional das receptoras e a concentração sérica de progesterona (Pope, 1988; Mello et al., 2016b).

A perda de viabilidade embrionária está diretamente relacionada com a baixa sincronidade, podendo ser originada do tempo gasto do transporte à transferência (Marinho et al., 2012). A distância entre os laboratórios e as fazendas compromete a qualidade embrionária, uma vez que na grande maioria das vezes, realiza-se a transferência do embrião a fresco (Teixeira, 2013).

Uma das alternativas utilizadas para longas distâncias é o transporte de embriões ainda em fase de cultivo e em diferentes estágios, mantidos em incubadora portátil com atmosfera gasosa controlada. Essa, porém, torna-se inviável economicamente por necessitar de incubadora com controle atmosférico e manipulação de técnico especializado para envase dos embriões na propriedade (Cavalieri et al., 2015).

1.3. Fatores que influenciam a produção *in vitro* de embriões

Alguns fatores podem causar limitações na PIVE, como o acúmulo de lipídeos no citoplasma (Mata-Campuzano et al., 2012) e membrana plasmática dos embriões, as EROS, e conseqüentemente, o desequilíbrio redox e estresse oxidativo (Agarwal et al., 2006).

O alto teor de lipídeos existente no citoplasma de embriões *in vitro* é considerado o principal fator para a baixa criotolerância desses (Mucci et al., 2006) e a maior sensibilidade ao estresse oxidativo (Ambruosi et al., 2009). Esse acúmulo de lipídeos, porém, também apresenta importante papel fisiológico, já que são potenciais reservatórios de energia para o desenvolvimento embrionário até implantação (Sturmei et al., 2009).

A adição de componentes como o SFB aos meios de cultura da produção *in vitro* pode aumentar as taxas de clivagem e blastocistos produzidos (Leivas et al., 2011), porém, podem causar prejuízos na qualidade dos embriões e estabelecimento da gestação (Garcia et al., 2015).

Mesmo ainda não estando claro o que realmente provoca o acúmulo de lipídeos, evidências indicam a presença de SFB ao meio de cultivo como fator de influência (Sudano et al., 2014). De fato, pesquisas mostram que embriões cultivados em meio livre de SFB tiveram redução no teor de lipídeos citoplasmáticos e menor criointolerância à criopreservação que embriões cultivados em meio suplementado com soro (Pereira e Marques, 2008), no entanto, também houve redução na produção de blastocistos (Dode et al., 2013).

Embriões de mamíferos produzidos *in vitro* são mais sensíveis ao estresse oxidativo pela alta concentração de lipídeos na membrana plasmática (Mata-Campuzano et al., 2012) e exposição a altas concentrações de oxigênio durante o sistema de produção (Agarwal et al., 2006). Esse estresse é consequência do desequilíbrio na produção de EROS e/ou redução de agentes antioxidantes (Gupta et al., 2010).

O termo EROS inclui todos os radicais livres e não radicais derivados da reação de redução das moléculas de oxigênio, são eletronicamente instáveis e altamente reativos, podendo exercer função de agente oxidante ou agente redutor (Agarwal et al., 2005). Os três principais radicais são o superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a hidroxila (OH^-) (Al-Gubory et al., 2010).

A formação de EROS ocorre durante o metabolismo aeróbico e exerce importante papel em vários processos fisiológicos essenciais para manutenção das funções biológicas (Burton e Jauniaux, 2011). Entretanto, o desequilíbrio desses radicais provoca efeitos

deletérios sobre as funções celulares como a peroxidação de lipídeos, alterações estruturais nas mitocôndrias, desnaturação de proteínas, bloqueio no desenvolvimento embrionário, depleção de ATP e apoptose celular (Agarwal et al., 2005). Durante as reações de busca por estabilidade das EROS, as mitocôndrias e o retículo endoplasmático liso são os mais lesionados pela oxidação gerada (Gupta et al., 2010).

O equilíbrio de EROS é fundamental para ocorrência adequada da expressão gênica e metabólica durante o desenvolvimento embrionário (Takahashi, 2012). O estresse oxidativo influencia a eficiência da PIVE, provocando alterações negativas durante todo o processo (Andrade et al., 2010).

Estudos apontam que a maior predisposição na formação de EROS nos embriões produzidos *in vitro* é induzida por fatores endógenos e exógenos durante o cultivo (Agarwal et al., 2006) e como estratégia para minimizar esse estresse oxidativo, estudos recomendam o processo de cultivo sob baixa tensão de oxigênio (Mingoti, 2005).

Uma vez que, a tensão de oxigênio nas incubadoras (20% O₂) normalmente é bem mais alta que o ambiente uterino (2-5% O₂), sendo um grande fator de estresse para o embrião, intensificando a produção de EROS, e resultando em queda na quantidade e qualidade dos embriões produzidos (Agarwal et al., 2005).

A adição de antioxidantes aos meios de maturação (Tian et al., 2014), cultivo (Wang et al., 2014) e criopreservação (Salzano et al., 2014) também tem sido indicada para reduzir a formação desses radicais e melhorar a qualidade e desenvolvimento embrionário (Mukherjee et al., 2014). Uma vez que, vários antioxidantes não enzimáticos são capazes de proteger as células contra os danos causados por EROS (Guérin et al., 2001).

1.4. Antioxidantes

Os antioxidantes são capazes de converter EROS em água e oxigênio, evitando o aumento de concentração desses radicais e eventual estresse oxidativo (Andrade et al., 2010). São classificados em antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.

Os enzimáticos são compostos por enzimas como a superóxido dismutase, catalase, glutathione, glutathione reductase e glutathione peroxidase, capazes de neutralizar a produção excessiva de EROS e prevenir danos na estrutura celular (Valko et al., 2007).

Os não enzimáticos (sintéticos ou suplementados) são formados por diversos compostos de baixo peso molecular como o ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol

(vitamina E), selênio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido lipoico (Nordberg e Arnér, 2001), glutationa, betacaroteno e caroteno (Maia, 2006). Atuam, como removedor do radical antes da lesão ou como reparador da lesão causada (Andrade et al., 2010)

Antioxidantes como a melatonina e o resveratrol têm demonstrado efeitos benéficos na produção *in vitro* de embriões, reduzindo as EROS e melhorando a qualidade (Mukherjee et al., 2014) e desenvolvimento embrionário (Wang et al., 2014), despertando o interesse de pesquisadores em busca de melhores resultados.

1.4.1. Melatonina

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é uma indolamina derivada do aminoácido triptofano e sintetizada pela glândula pineal e por outros locais extrapineais (Siu et al., 2006), como os olhos, ovários e testículos (Reiter et al., 2013).

Possui importante papel na transmissão da duração do período claro/escuro para o sistema circadiano, fundamental em processos fisiológicos como a indução do sono, melhora do sistema imunológico e regulação do sistema endócrino na reprodução sazonal dos mamíferos (Reiter et al., 2014). Devido suas propriedades na regulação da síndrome metabólica e de perfis lipídicos, tem sido utilizada não só para indução do sono, como também para o emagrecimento na medicina humana (Kostoglou, 2013).

Além disso, apresenta função antioxidante, protegendo os organismos de estresse oxidativo (Reiter et al., 2016). Devido sua estrutura hidrofílica e hidrofóbica, atravessa facilmente as barreiras, atuando diretamente sobre as EROS ou estimulando a ação de enzimas antioxidantes endógenas como a superóxido dismutase, glutationa redutase e catalase, e inibindo a ação de enzimas pró-oxidantes como a cicloxigenase (Anisimov et al., 2006).

Na reprodução, a melatonina tem sido associada a qualidade dos oócitos e desenvolvimento saudável do embrião (Jin et al., 2017). Foi demonstrado em diversos estudos que a grande concentração de melatonina no fluido folicular está diretamente relacionada com a prevenção da atresia e desenvolvimento do folículo pré-ovulatório, além da proteção do oócito contra os radicais livres durante a ovulação (Tamura et al., 2009; Reiter et al., 2009).

Na PIVE, a melatonina tem demonstrado ser capaz de melhorar as taxas de clivagem e de blastocisto, além de aumentar o conteúdo mitocondrial e o número de células totais quando adicionada ao meio de maturação (Casao et al., 2010; Su et al.,

2015). Quando adicionada ao meio de cultivo, estudos demonstram o aumento das taxas de clivagem, blastocisto e eclosão, além da redução de EROS e número de células apoptóticas. Esses efeitos contribuem para melhor qualidade e desenvolvimento embrionário, com aumento da taxa de gestação (Manjunatha et al., 2009; Mehaisen et al., 2015; Marques et al., 2018)

1.4.2. Resveratrol

O resveratrol (3, 4', 5-trihidroxiestilbeno) é um metabólito vegetal secundário produzido naturalmente em algumas plantas no processo de defesa contra microrganismos patógenos, protegendo-as contra infecções fúngicas e bacterianas (Kwak et al., 2012). É encontrado principalmente em sementes e cascas de uva, frutas vermelhas, vinho tinto e amendoim (Bertelli e Das, 2009).

Possui grande poder antioxidante, anti-inflamatório, anticancerígeno (Pirola e Fröjdö, 2008), cardioprotetor (Magyar et al., 2012) e antidiabetes, sendo bastante estudado e utilizado pela medicina humana e indústrias de dermocosméticos (Brasnyó et al., 2011).

No sistema reprodutor tem demonstrado reparar ovários com danos induzidos pela radiação e aumentar a reserva ovariana em situações associadas ao envelhecimento, obesidade e diabetes mellitus (Ozcan et al., 2015; Said et al., 2016).

Além de ser um potente sequestrador de EROS, o resveratrol promove a ativação da enzima Sirtuina 1 (Wang et al., 2014), que auxilia no controle da função mitocondrial, envelhecimento, apoptose, resistência ao estresse celular e regulação do metabolismo (Takeo et al., 2014). A ativação dessa enzima contribui na qualidade de oócitos, inclusive com idade avançada, e no desenvolvimento embrionário (Kawamura et al., 2010; Zhang et al., 2014).

Na PIVE, a adição de resveratrol ao meio de maturação tem demonstrado aumentar o potencial mitocondrial com maior síntese de ATP, diminuir a transcrição de genes apoptóticos (Kwak et al., 2012; Sugiyama et al., 2015), além do efeito antioxidante direto na redução de EROS ou estímulo na síntese de glutatona (Wang et al., 2018). Esses benefícios associados à capacidade de promover o aumento da secreção de progesterona e diminuição de estradiol pelas células do cumulus contribuem positivamente com a melhora da expansão do cumulus, maior resistência do oócito e maior taxa de blastocisto (Wang et al., 2014).

Quando adicionado ao meio de cultivo, tem proporcionado melhoria na qualidade e quantidade de blastocistos (Lee et al., 2018) e elevação na taxa de sobrevivência de embriões recultivados após vitrificação e descongelamento (Salzano et al., 2014).

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive biology and endocrinology* 2005; 3:28.

Agarwal A, Said TM, Bedaiwy MA, Banerjee J, Alvarez JG. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertil Steril* 2006; 86:503-512.

Aheem KA. An insight into maternal recognition of pregnancy in mammalian species. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 2017; 16(1): 1-6.

Al-Gubory KH, Fowler PA, Garrel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *The international journal of biochemistry and cell biology* 2010; 42:1634-1650.

Alves MSD, Cruz VLB. *Embriologia*. 7ª ed. Belo Horizonte: Imprensa Universitária da UFMG; 2002.

Ambrosi B, Lacalandra GM, Iorga AI, De Santis T, Mugnier S, Matarrese R, Goudet, G, Dell'Aquila ME. Cytoplasmic lipid droplets and mitochondrial distribution in equine oocytes: Implications on oocyte maturation, fertilization and developmental competence after ICSI. *Theriogenology* 2009; 71:1093–1104.

Andrade ER, Melo-Sterza FA, Seneda MM, Alfieri AA. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 2010; 34:79-85.

Andrade GA, Fernandes MA, Knychala RM, Pereira Junior MV, Oliveira AJ, Nunes DP, Bonato GL, Santos RM. Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos in vitro. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 2012; 36:66-69.

Anisimov VN, Popovich IG, Zabezhinski MA, Anisimov SV, Vesnushkin GM, Vinogradova IA. Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 2006; 1757:573-589.

Bertelli AA, Das DK. Grapes, wines, resveratrol, and heart health. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009; 54:468-76.

Brasnyó P, Molnár GA, Mohás M, Markó L, Laczy B, Cseh J, Mikolás E, Szijártó IA, Mérei Á, Halmai R, Mészáros LG, Sümegi B, Wittmann I. Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. *Br J Nutr* 2011; 106:383-389.

Bueno AP, Beltran MP. Produção in vitro de embriões bovinos. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária* 2008; 6:1-7.

Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 2011; 25:287-299.

Casao A, Abecia JA, Pérez JC, Blanco TM, Vázquez MI, Forcada F. The effects of melatonin on in vitro oocyte competence and embryo development in sheep. *Spanish Journal of Agricultural Research* 2010; 8(1): 35-41.

Cavalieri FLB, Andreazzi MA, Colombo AHB, Emanuelli IP, Moreski DAB, Silva WM. Estudo sobre o cultivo in vitro de embriões bovinos durante o transporte. *Ars Veterinaria* 2015; 31:07-11.

Clemente M., de La Fuente J, Fair T, Al Naib A, Gutierrez-Adan A, Roche JF, Rizos D, Lonergan P. Progesterone and conceptus elongation in cattle: A direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? *Reproduction* 2009; 138:507–517.

Corcoran D, Fair T, Park S, Rizos D, Patel OV, Smith GW, Coussens PM, Ireland JJ, Boland MP, Evans ACO, Lonergan P. Suppressed expression of genes involved in transcription and translation in in vitro compared with in vivo cultured bovine embryos. *Reproduction* 2006; 131(4):651-60.

Crosier AE, Farin PW, Dykstra MJ, Alexander JE, Farin CE. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. *Biology of Reproduction* 2001; 64:1375-1385.

Dode MAN, Leme LO, Sprícigo JFW. Criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro. *Revista Brasil Reprodução Animal* 2013; 37:145-150.

Enciso M, Cisale H, Johnston SD, Sarasa J, Fernandez JL, Gosálvez J. Major morphological sperm abnormalities in the bull are related to sperm DNA damage. *Theriogenology* 2011; 76: 23-32.

Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G. Bovine embryo technologies. *Theriogenology* 2003; 59:599-616.

Gandhi AP, Lane M, Gardner DK, Krisher RL. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. *Human Reproduction* 2000; 15:395-401.

Garcia JM, Avelino KB, Vantini R. 2008. Estado da arte da fertilização in vitro em bovinos. In: Simpósio Nacional de Reprodução animal aplicada, Biotecnologia da reprodução em bovinos. Jaboticabal: UNESP; 2008.

Garcia SM, Marinho LSR, Lunardelli PA, Seneda MM, Meirelles FV. Developmental block and programmed cell death in *Bos indicus* embryos: effects of protein supplementation source and developmental kinetics. *PLoS One* 2015; 10:e0119463.

Gonçalves PBD, Barreta MB, Sandri LR, Ferreira R, Antoniazzi AQ. Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 2007; 31:212-217.

Gonçalves PBD, Figueredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. 2ª ed. São Paulo: Roca; 2008.

Gonçalves PBD, Visintin JA, Oliveira MAL, Montagner MM, Costa L. Produção in vitro de Embriões. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 1ª ed. São Paulo: Livraria Varela; 2001. p. 195–226.

Guérin P, El Mouatassim S, Ménézo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. Human Reproduction Update 2001; 7:175–89.

Gupta MK, Uhm SJ, Lee HT. Effect of vitrification and beta-mercaptoethanol on reactive oxygen species activity and in vitro development of oocytes vitrified before or after in vitro fertilization. Fertility and Sterility 2010; 93:2602-2607.

Haas GTS, De Carvalho Fernandes CA, Da Costa EP, Alves Torres CA, Fernandes Marques PA, Guiselli Lopes F, Rêgo de Paula TA. Taxa de prenhez e concentração sérica de progesterona em novilhas receptoras de embrião tratadas com somatotropina recombinante bovina (rbst). Revista Ceres 2007; 54: 311.

Hosseini SM, Forouzanfar M, Hajian M. Antioxidant supplementation of culture medium during embryo development and/or after vitrification-warming is the most important? Journal of Assisted Reproduction and Genetics 2009; 26:355- 364.

Jin J-X, Lee S, Taweechaipaisankul A, Kim GA, Lee BC. Melatonin regulates lipid metabolism in porcine oocytes. J Pineal Res 2017; 62:123-188.

Kawamura Y, Uchijima Y, Horike N, Tonami K, Nishiyama K, Amano T, Asano T, Kurihara Y, Kurihara H. Sirt3 protects *in vitro*-fertilized mouse preimplantation embryos against oxidative stress-induced p53-mediated developmental arrest. The Journal Clinical Investigation 2010; 120(8): 2817-2828.

Kostoglou-Athanassiou I. Therapeutic applications of melatonin. Ther Adv Endocrinol Metab 2013; 4(1):13-24.

Kwak SS, Cheong SA, Jeon Y, Lee E, Choi KC, Jeung EB, Hyun SH. The effects of resveratrol on porcine oocyte in vitro maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and in vitro fertilization. Theriogenology 2012; 78:86-101.

Lee S, Jin JX, Taweechaipaisankul A, Kim GA, Lee BC. Synergistic effects of resveratrol and melatonin on in vitro maturation of porcine oocytes and subsequent embryo development. Theriogenology 2018; 114:191-198.

Leivas FG, Brum DS, Fialho SS, Saliba WP, Alvim MTT, Bernardi ML, Rubin MIB, Silva CAM. Fetal calf serum enhances in vitro production of *Bos taurus indicus* embryos. Theriogenology 2011; 75:429-33.

Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. Reproduction in Domestic Animals 2003; 38: 259-267.

Machaty Z, Peippo J, Peter A. Production and manipulation of bovine embryos: Techniques and terminology. Theriogenology 2012; 78:937-950.

Magyar K, Halmosi R, Palfi A, Feher G, Czopf L, Fulop A, Battyany I, Sumegi B, Toth K, Szabados E. Cardioprotection by resveratrol: A human clinical trial in patients with stable coronary artery disease. *Clin Hemorheol Microcirc* 2012; 50:179-187.

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

Manjunatha BM, Devaraj M, Gupta PSP, Ravindra JP, Nandi S. Effect of taurine and melatonin in the culture medium on buffalo in vitro embryo development. *Reprod Domest Anim* 2009; 44:12-16.

Mann GE, Lamming GE. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction* 2001; 121, 175–180.

Marinho LSR, Untura RM, Morotti F, Moino LL, Rigo AG, Sanches BV, Pontes JHF, Seneda MM. Large-scale programs for recipients of in vitro-produced embryos. *Animal Reproduction* 2012; 9:323-28.

Marques TC, Da Silva Santos EC, Diesel TO, Leme LO, Martins CF, Dode MAN, Alves BG, Costa FPH, De Oliveira EB, Gambarini ML. Melatonin reduces apoptotic cells, SOD2 and HSPB1 and improves the in vitro production and quality of bovine blastocysts. *Reproduction in Domestic Animals* 2018; 53(1):226-236.

Martins GHL. Efeito da estimulação ovariana com o uso de FSH sobre a taxa de recuperação ovocitária e produção in vitro de embriões na raça Sindi. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Universidade de Brasília, Brasília. 2014.

Mata-Campuzano M, Alvarez-Rodríguez M, del Olmo E, Fernández-Santos MR, Garde JJ, Martínez-Pastor F. Quality, oxidative markers and DNA damage (DNA) fragmentation of red deer thawed spermatozoa after incubation at 37 °C in presence of several antioxidants. *Theriogenology* 2012; 78: 1005–1019.

Mehaisen GM, Saeed AM, Gad A, Abass AO, Arafa M, El-Sayed A. Antioxidant capacity of melatonin on preimplantation development of fresh and vitrified rabbit embryos: Morphological and molecular aspects. *PloS one* 2015, 10:e0139814.

Mello RRC, Ferreira JE, de Sousa SLG, de Mello MRB, Palhano HB. Produção in vitro (PIV) de embriões em bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 2016a; 40:58-64.

Mello RRC, Morais MEO, Ferreira JE, Mello MRB. Taxa de prenhez em receptoras bovinas com diferentes graus de assincronia embrião-útero. *Boletim de Indústria Animal* 2016b; 73:88-93.

Mingoti GZ. Aspectos técnicos da produção in vitro de embriões bovinos. In: *Tópicos Avançados em Biotecnologia da Reprodução*. Jaboticabal: Funep; 2005.

Mucci N, Aller J, Kaiser GG, Hozbor F, Cabodevila J, Alberio RH. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology* 2006; 65:1551-1562.

Mukherjee A, Malik H, Saha AP, Dubey A, Singhal DK, Boateng S, Saugandhika S, Kumar S, De S, Guha SK, Malakar D. Resveratrol treatment during goat oocytes maturation enhances developmental competence of parthenogenetic and hand-made cloned blastocysts by modulating intracellular glutathione level and embryonic gene expression. *Journal of assisted reproduction and genetics* 2014; 31:229-239.

Mundim TC, Ramos AF, Sartori R, Dode MA, Melo EO, Gomes LF, Rumpf R, Franco MM. Changes in gene expression profiles of bovine embryos produced in vitro, by natural ovulation, or hormonal superstimulation. *Genetics and Molecular Research* 2009; 8:1398-1407.

Nordberg J, Árner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine* 2001; 31:1287-1312.

Ozcan P, Ficicioglu C, Yildirim OK, Ozkan F, Akkaya H, Aslan I. Protective effect of resveratrol against oxidative damage to ovarian reserve in female Sprague-Dawley rats. *Reprod BioMed Online* 2015; 31: 404-410

Pereira RM, Marques CC. Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell and Tissue Banking* 2008; 9:267-277.

Pirola L, Fröjdö S. Resveratrol: one molecule, many targets. *IUBMB Life* 2008; 60:323-332.

Pontes JHF, Nonato-Junior I, Sanches BV, Ereno-Junior JC, Uvo S, Barreiros TRR, Oliveira JA, Hasler JF, Seneda MM. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology* 2009; 71:690-697.

Pope WF. Uterine asynchrony: A cause of embryonic loss. *Biology of Reproduction* 1988; 39, 999-1003.

Ramos AA, Palhano HB, Jacob JCF, Três JE. Biotecnologia da Reprodução – Fêmeas. In: Palhano HB, Jesus VLT, Três JE, Jacob JCF, Moreira Alves PA, Reprodução em Bovinos: Fisiopatologia, terapêutica, manejo e biotecnologia. 2ª ed. Rio de Janeiro: Ed L.F.Livros; 2008. p. 181.

Reiter RJ, Mayo JC, Tan DX, Sainz RM, Alatorre-Jimenez M, Qin L. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J Pineal Res* 2016; 61:253-278.

Reiter RJ, Rosales-Corral SA, Manchester LC, Tan DX. Peripheral reproductive organ health and melatonin: ready for prime time. *Int J Mol Sci* 2013; 14:7231–7272.

Reiter RJ, Tan DX, Galano A. Melatonin: exceeding expectations. *Physiology (Bethesda)* 2014; 29:325–333.

Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Paredes SD, Mayo JC, Sainz RM. Melatonin and reproduction revisited. *Biol Reprod* 2009; 81:445-456.

Roberts RM. A novel group of interferons associated with the early ovine and bovine embryo. *J Interferon Res* 1989; 9:373–378.

Said RS, El-Demerdash E, Nada AS, Kamal MM. Resveratrol inhibits inflammatory signaling implicated in ionizing radiation-induced premature ovarian failure through antagonistic crosstalk between silencing information regulator 1 (SIRT1) and poly (ADPribose) polymerase 1 (PARP-1). *Biochem Pharmacol* 2016; 103:140-150.

Salzano A, Albero G, Zullo G, Neglia G, Abdel-Wahab A, Bifulco G, Zicarelli L, Gasparrini B. Effect of resveratrol supplementation during culture on the quality and cryotolerance of bovine in vitro produced embryos. *Animal Reproduction Science* 2014; 151:91-96.

Sánchez JM, Mathew DJ, Passaro C, Fair T, Lonergan P. Embryonic maternal interaction in cattle and its relationship with fertility. *Reproduction in domestic animals* 2018; 53: 20-27.

Siu AW, Maldonado M, Sanchez-Hidalgo M, Tan DX, Reiter RJ. Protective effects of melatonin in experimental free radical-related ocular diseases. *Journal of pineal research* 2006; 40:101-109.

Stringfellow DA, Seidel SM. *Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões*. IETS 1998; 112-113.

Sturmev RG, Reis A, Leese HJ, McEvoy TG. Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. *Reproduction in Domestic Animals* 2009; 44:50-58.

Su J, Wang Y, Xing X, Zhang L, Sun H, Zhang Y. Melatonin significantly improves the developmental competence of bovine somatic cell nuclear transfer embryos. *Journal of pineal research* 2015; 59(4): 455-468.

Sudano MJ, Paschoal DM, da Silva Rascado T, Crocomo LF, Magalhães LCO, Junior AM, Machado R, da Cruz Landim-Alvarenga F. Crucial surviving aspects for vitrified in vitro-produced bovine embryos. *Zygote* 2014; 22:124-131.

Sugiyama M, Kawahara-Miki R, Kawana H, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. Resveratrol-induced mitochondrial synthesis and autophagy in oocytes derived from early antral follicles of aged cows. *J Reprod Dev* 2015; 61:251–259.

Takahashi M. Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of mammalian embryos. *Journal of Reproduction and Development* 2012; 58:1-9.

Takeo S, Sato D, Kimura K, Monji Y, Kuwayama T, Kawahara-Miki R, Iwata H. Resveratrol Improves the Mitochondrial Function and Fertilization Outcome of Bovine Oocytes. *J Reprod Dev* 2014; 92:99-60.

Tamura H, Nakamura Y, Korkmaz A, Manchester LC, Tan DX, Sugino N, Reiter RJ. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implication. *Fertil Steril* 2009; 92, 328–343.

Teixeira JR. Transporte e cultivo de embriões bovinos por 24, 48 e 72 horas antes da transferência. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2013.

Tian X, Wang F, He C, Zhang L, Tan D, Reiter RJ, Xu J, Ji P, Liu G. Beneficial effects of melatonin on bovine oocytes maturation: a mechanistic approach. *Journal of pineal research* 2014; 57:239-247.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(1):44-84.

Van Wagendonk-de Leeuw AM. Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. *Theriogenology* 2006; 65:914-925.

Varago FC, Mendonça LF, Lagares MA. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 2008; 32:100-109.

Viana JHM. A produção de embriões bovinos em 2017: O mercado em stand-by. In: *Jornal O Embrião*. 62 ed. ano XXXII. 2018; p:6-10.

Wang F, Tian X, Zhang L, Gao C, He C, Fu Y, Ji P, Li Y, Li N, Liu G. Beneficial effects of melatonin on in vitro bovine embryonic development are mediated by melatonin receptor 1. *Journal of pineal research* 2014; 56:333-342.

Wang Y, Zhang M, Chen ZJ, Du Y. Resveratrol promotes the embryonic development of vitrified mouse oocytes after in vitro fertilization. *In Vitro Cellular e Developmental Biology-Animal* 2018; 54(6): 430-438.

Watson AJ, Natale DR, Barcroft LC. Molecular regulation of blastocyst formation. *Animal reproduction science* 2004; 82:583-592.

Yanagimachi R. Sperm capacitation and gamete interaction. *Journal Reproduction and Fertility* 1994; 38:27-33.

Zhang L, Hou X, Ma R, Moley K, Schedl T, Wang Q. Sirt2 functions in spindle organization and chromosome alignment in mouse oocyte meiosis. *The FASEB Journal, Jiangsu* 2014; 28(3): 1435–1445.

CAPÍTULO 2 - ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo redigido segundo as normas da revista científica: Revista Colombiana de
Ciencias Pecuarias

VIABILIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* TRANSPORTADOS POR DIFERENTES TEMPOS EM MEIO DE MANUTENÇÃO COM ANTIOXIDANTES

**FEASIBILITY OF BOVINE EMBRYOS PRODUCED *IN VITRO*
TRANSPORTED DIFFERENT TIMES WITH MAINTENANCE WITH
ANTIOXIDANTS**

**VIABILIDAD DE EMBRIONES BOVINOS PRODUCIDOS EN VITRO
TRANSPORTADOS POR DIFERENTES TIEMPOS EN MANTENIMIENTO
CON ANTIOXIDANTES**

Resumo

Antecedentes: O uso de antioxidantes tem demonstrado efeitos benéficos na produção *in vitro* de embriões, reduzindo as espécies reativas de oxigênio e melhorando a qualidade e desenvolvimento embrionário. **Objetivo:** Avaliar o efeito da adição dos antioxidantes resveratrol e melatonina ao meio de manutenção sobre a viabilidade de embriões bovinos produzidos *in vitro*, mantidos a 36°C em diferentes tempos de simulação de transporte. **Métodos:** No sétimo dia de cultivo *in vitro*, embriões grau I e II em estágio de blastocisto inicial (Bi), blastocisto (Bl) e blastocisto expandido (Bx) foram selecionados e distribuídos aleatoriamente em três condições de manutenção: controle (meio de manutenção), melatonina (meio de manutenção + melatonina a 10⁻⁹M) e resveratrol (meio de manutenção + resveratrol a 0,5μM). Para simular o transporte, as palhetas com embriões foram colocadas em transportadora de embriões a 36°C e mantidas por 6, 9 e 12 horas. Transcorrido o tempo determinado conforme o tratamento, os embriões foram desensados e recultivados em meio de cultivo por 72 horas para avaliação da qualidade e desenvolvimento embrionário. **Resultados.** Com 72 horas de recultivo não se observou diferença entre os tratamentos no percentual de embriões que desenvolveram, degeneraram e eclodiram. O desenvolvimento e qualidade embrionária não sofreram efeito do meio e tempo de simulação de transporte. Embriões envasados no estágio de Bx apresentaram maiores taxas de eclosão e menores taxas de degeneração. **Conclusão:** É viável o transporte de embriões bovinos, frescos, produzidos *in vitro*, em meio de manutenção sem suplementação dos antioxidantes estudados por 12 horas em transportadora a 36°C. Embriões envasados no estágio Bx, independentemente do tempo de simulação de transporte, apresentaram maior viabilidade.

Palavras-chave: *Bos taurus*, desenvolvimento embrionário, fertilização *in vitro*, melatonina, resveratrol, transporte embrionário.

Abstract

Background: The antioxidants use has produced beneficial effects on the embryos *in vitro* production, decreasing reactive oxygen species and development of quality and embryonic development. **Objective:** To evaluate the process of adding antioxidants and melatonin to the maintenance medium on the bovine embryos viability produced *in vitro* at 36°C in different transport simulation times. **Methods:** On the seventh day of *in vitro* culture, embryos grade I and II in the initial blastocyst stage (B1), blastocyst (B1) and expanded blastocyst (B1) were randomly selected and distributed in three maintenance stages: control (maintenance medium), melatonin (maintenance medium + 10⁻⁹M melatonin) and resveratrol (maintenance medium + 0.5µM resveratrol). To simulate the transport, the embryo vanes were placed in embryo carrier at 36 ° C and maintained for 6, 9 and 12 hours. After the time determined according to the regimen, the embryos were developed and regrowth in the culture medium for 72 hours for quality evaluation and embryonic development. **Results:** With 72 hours of regrowth, no difference was observed between treatments in the embryos percentage that developed, degenerated and hatched. The development and embryonic quality were not affected by the mean and time of transport simulation. Embryos packed in the Bx stage had higher hatch rates and lower degeneration rates. **Conclusion:** It is feasible to transport bovine embryos, fresh, produced *in vitro*, in maintenance medium without antioxidants supplementation for 12 hours in transport at 36°C. Packaged embryos in stage Bx, regardless of transport simulation time had higher viability speed.

Keywords: *Bos Taurus*, embryonic development, *in vitro* fertilization, melatonin, resveratrol, embryonic transport.

Resumen

Antecedentes: El uso de antioxidantes ha demostrado efectos beneficiosos en la producción *in vitro* de embriones, reduciendo las especies reactivas de oxígeno y mejorando la calidad y el desarrollo embrionario. **Objetivo:** Evaluar el efecto de la adición de los antioxidantes resveratrol y melatonina al medio de mantenimiento sobre la viabilidad de embriones bovinos producidos *in vitro*, mantenidos a 36°C en diferentes tiempos de simulación de transporte. **Métodos:** En el séptimo día de cultivo *in vitro*, embriones grado I y II en fase de blastocisto inicial (Bi), blastocisto (Bl) y blastocisto expandido (Bx) fueron seleccionados y distribuidos aleatoriamente en tres condiciones de mantenimiento: control (medio de mantenimiento), melatonina (medio de mantenimiento + melatonina a 10⁻⁹M) y resveratrol (medio de mantenimiento + resveratrol a 0,5µM). Para simular el transporte, las paletas con embriones fueron colocadas en transportadora de embriones a 36°C y mantenidas por 6, 9 y 12 horas. Transcurrido el tiempo determinado según el tratamiento, los embriones fueron desensados y recultivados en medio de cultivo por 72 horas para evaluación de la calidad y desarrollo embrionario. **Resultados:** Con 72 horas de recultivo no se observó diferencia entre los tratamientos en el porcentaje de embriones que desarrollaron, degeneraron y eclosionaron. El desarrollo y calidad embrionaria no han tenido efecto del medio y tiempo de simulación de transporte. Los embriones envasados en la etapa de Bx presentaron mayores tasas de eclosión y menores tasas de degeneración. **Conclusión:** Es viable el transporte de embriones bovinos, frescos, producidos *in vitro*, en medio de mantenimiento sin suplementación de los antioxidantes estudiados por 12 horas en transportadora a 36°C. Los embriones envasados en la etapa Bx, independientemente del tiempo de simulación de transporte, presentaron mayor viabilidad.

Palabras clave: *Bos taurus*, desarrollo embrionario, fertilización *in vitro*, melatonina, resveratrol, transporte embrionario.

Introdução

Os embriões produzidos *in vitro* são mais sensíveis que os produzidos *in vivo*, por causa do sistema de produção, que ocorre em altas concentrações de O₂ e ao maior acúmulo de lipídeos intracelular, com consequente susceptibilidade à ação de espécies reativas de oxigênio (EROS) (Agarwal et al., 2006). Tais fatores, provocam lesões celulares (Gupta et al., 2010) e alterações na expressão de genes fundamentais para qualidade e desenvolvimento embrionário (Stinshoff et al., 2011).

O meio de manutenção é utilizado para transporte do embrião fresco em menor período possível, permitindo a continuidade do desenvolvimento e evitando o estresse oxidativo. Uma vez que, a viabilidade embrionária, e consequentemente, a taxa de gestação pode ser influenciada pelo tempo gasto no transporte (Marinho et al., 2012).

A inclusão de antioxidantes como a melatonina (Wang et al., 2014) e o resveratrol (Mukherjee et al., 2014) ao meio de maturação (Tian et al., 2014) e ao meio de cultivo tem sido estudada, buscando reduzir o estresse oxidativo gerado durante a produção *in vitro* de embriões (PIVE), e consequentemente, a melhoria da viabilidade embrionária, promovendo melhores condições para o desenvolvimento (Wang et al., 2014).

Visando manter a qualidade embrionária após períodos críticos de estresse oxidativo, como o processo de congelamento e descongelamento, estudos propõe o fornecimento de uma fonte excedente de antioxidantes exógenos durante o recultivo dos embriões (Hosseini et al., 2009).

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é uma amina derivada da descarboxilação do triptofano e sintetizada pela glândula pineal e por outros locais extrapineais (Siu et al., 2006). Sua utilização tem sido alvo de estudos para produção *in vitro* de embriões humanos (Khan et al., 2015) e de animais como camundongos (Ren et al., 2015), ovinos (Vázquez et al., 2010), suínos (Li et al., 2015), búfalos (Manjunatha et al., 2009), coelhos (Mehaisen et al., 2015) e bovinos (Zhao et al., 2016), por possuir atuação direta sobre as EROS, estimular a atividade de enzimas antioxidantes endógenas como a superóxido dismutase, glutatona redutase e catalase, além da ação inibitória sobre enzimas pró-oxidantes como a cicloxigenase (Anisimov et al., 2006).

O resveratrol (3, 4', 5-trihidroxiestilbeno) é uma fitoalexina polifenólica que ocorre naturalmente em algumas plantas no processo de defesa contra microorganismos patógenos, protegendo-as contra infecções fúngicas e bacterianas (Kwak et al., 2012).

O aumento de concentrações intracelulares de glutatona nos oócitos é relatada com a adição de resveratrol ao meio de maturação (Combelles et al., 2009), e quando adicionado ao meio de cultivo confere melhoria na qualidade dos embriões, favorecendo o desenvolvimento durante o recultivo. A utilização também promove aumento da taxa de sobrevivência e eclosão após vitrificação e descongelamento (Salzano et al., 2014).

No entanto, poucos estudos investigaram os efeitos da melatonina e do resveratrol adicionados ao meio de manutenção sobre a qualidade e desenvolvimento embrionário. Neste intuito, objetivou-se avaliar o efeito da adição dos antioxidantes resveratrol e melatonina ao meio de manutenção sobre a viabilidade de embriões bovinos produzidos *in vitro*, mantidos a 36°C em diferentes tempos de simulação de transporte.

Materiais e Métodos

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Goiás, Brasil sob protocolo número 5391020718.

Local de estudo e meios utilizados

O estudo foi conduzido no Laboratório de Reprodução Animal do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde (Rio Verde, Goiás, Brasil) e todos os meios de cultura utilizados para a PIVE foram adquiridos da empresa Progest Biotecnologia em Reprodução e Saúde Animal (Botucatu, São Paulo, Brasil) com lotes previamente testados, conforme listagem e composição descrita:

Meio de lavagem - TCM 199 tamponado com Hapes, suplementado com 0,2mM piruvato, 10% SFB (v/v), 5mg/mL BSA, 75ug/mL amicacina.

Meio de maturação - TCM 199 com sais de Earl's, suplementado com 75ug/mL amicacina, 4mg/mL BSA, 1ug/mL de L-glutamina e 0,01UI/mL de FSHr.

Meio de fertilização (FIV) - TALP-FIV suplementado com 6mg/mL BSA (livre de ácidos graxos), 0,2mM piruvato e 75µg/mL amicacina.

Meio de fecundação (FEC) - TALP-FIV suplementado com 6mg/mL BSA (livre de ácidos graxos), 0,2mM piruvato, 30µg/mL heparina, 20µM penicilamina, 10µM hipotaurina, 1µM epinefrina e 75µg/mL amicacina.

Meio CAP - Meio tamponado Tyrode's HEPES, suplementado com 0,2mM piruvato e 75µg/mL amicacina.

Meio de cultivo - SOFaa (Holm, et al. 1999) suplementado com 2,7mM mio-inositol, 0,2mM piruvato, 2,5% SFB (v/v), 5mg/mL BSA (livre de ácido graxo) e 75ug/mL amicacina.

Meio de manutenção - SOFaa (Holm, et al. 1999) tamponado com Hepes (HSOFaa), suplementado com 2,7mM mio-inositol, 0,2mM piruvato, 2,5% SFB (v/v), 5mg/mL BSA (livre de ácido graxo) e 75ug/mL amicacina.

Preparo das soluções estoque dos antioxidantes

Solução stock de Melatonina - Para obtenção da solução stock de Melatonina[®] (M5250, Sigma-Aldrich Company, St. Louis, MO, EUA), inicialmente preparou-se uma solução de 10^{-3} M (Mãe 1), com 0,0023g de melatonina homogeneizada primeiramente em 200µL de água milliQ e depois adicionando mais 9800µL de água MilliQ para se atingir a concentração desejada. Posteriormente, realizou-se nova diluição, utilizando 20µL da solução Mãe 1 (10^{-3} M) e 1980µL de água milliQ, para obtenção da concentração de 10^{-5} M (Mãe 2). Feito isso, para obtenção da concentração de 10^{-6} M da solução stock, foi utilizado 200µL da solução Mãe 2 e diluído em 1800µL de água milliQ. Após ser bem homogeneizada, a solução stock foi realiquotada em quantidades de 10µL e armazenadas em eppendorfs de 1,5mL recobertos por papel alumínio e mantidos em temperatura inferior a 0°C. Para utilização da solução Stock ao meio de manutenção, a solução foi descongelada em placa aquecedora a 36°C.

Solução stock de Resveratrol - O Resveratrol[®] (R5010, Sigma-Aldrich Company, St. Louis, MO, EUA) diluído foi manipulado por um período de 30 dias, após esse prazo, foi realizada nova diluição. A solução stock, apresentava em sua composição a concentração de 0,5µM de resveratrol. Para diluição foi utilizado 0,5706mg ou 0,0005706g de resveratrol, pesados em balança digital de precisão e diluídos em 5mL de etanol (99,8%). Depois de ser bem homogeneizada a solução stock foi realiquotada em quantidades de 10µL e armazenadas em eppendorfs de 1,5mL recobertos por papel alumínio e mantidos em temperatura inferior a 0°C. Para utilização da solução Stock ao meio de manutenção, a solução foi descongelada em placa aquecedora a 36°C.

Produção in vitro de embriões

Obtenção de oócitos - Para execução do experimento, ovários bovinos foram colhidos no abatedouro municipal local (COOPERCARNE – Cooperativa dos Comerciantes de Carne do Estado de Goiás, Rio Verde, Goiás, Brasil), com serviço de inspeção estadual (SIE) pela Agência Goiana de Defesa Agropecuária (AGRODEFESA). Logo após o abate e evisceração dos animais, os ovários foram removidos e mantidos dentro de garrafas térmicas em solução salina (0,9% de cloreto de sódio) a 35°C, sendo transportados ao laboratório e processados em até 4 horas.

No laboratório, os ovários foram lavados e mantidos em banho-maria com solução salina a 36°C e folículos com 3 a 8mm de diâmetro foram aspirados com o auxílio de seringa descartável de 10mL acoplada a agulha hipodérmica descartável calibre 18G (40x12mm). O fluido folicular e os complexos cumulus oócitos (CCO's) aspirados foram armazenados em tubos cônicos de poliestireno com capacidade de 15mL e mantidos em banho-maria a 36°C por 10 minutos até decantação.

Para rastreamento e seleção dos CCO's o fluido folicular sobrenadante foi centrifugado por 2 minutos a 1613 x g (6000 rpm) e utilizado como meio.

Maturação in vitro - Grupos de 30 a 35 CCO's com qualidade grau I e II, segundo Stojkovic et al. (2001), foram lavados em duas gotas de 100µL de meio de lavagem e duas gotas de 100µL de meio de maturação, em seguida foram incubados em gotas de 200µL de meio de maturação cobertas com óleo mineral (M5310, Sigma-Aldrich Company, St. Louis, MO, EUA) em placa de petri, por 24 horas em incubadora (Forma Series 3 Water Jacketed, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO₂ e umidade relativa saturada sem condensação.

Fertilização in vitro - Passado o período de 24 horas de maturação, os CCO's foram lavados em uma gota de 100µL de meio de maturação e duas gotas de 100µL de meio de fertilização (FIV), posteriormente foram transferidos para gotas de 200µL de meio de fecundação (FEC) em uma nova placa de petri, cobertas com óleo mineral.

Para a fertilização *in vitro*, o sêmen de um touro da raça Nelore de fertilidade comprovada foi descongelado a 35°C por 30 segundos, depositado sobre coluna de gradiente Percoll 45-90% segundo metodologia adaptada (Parrish et al., 1995) e centrifugado a 1613 x g (6000 rpm) por 6 minutos. O sedimento de espermatozoides foi

ressuspendido em 1mL de meio CAP e centrifugado novamente a 1613 x g (6000 rpm) por 2 minutos.

O pellet formado foi diluído em 100µL de meio de fertilização (FIV) e após observação da motilidade e vigor, cada gota foi fertilizada com concentração final de $1,0 \times 10^6$ espermatozoides vivos/mL. O volume da dose inseminante foi calculado considerando o volume da gota (µL) dividido pela concentração média encontrada na câmara de Neubauer, dividido pela motilidade final. As placas foram incubadas a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO₂ e umidade relativa saturada sem condensação por 24 horas.

Cultivo in vitro - Terminado o tempo de incubação da fertilização, realizou-se a retirada parcial das células do cumulus por sucessivas pipetagens. Os possíveis zigotos foram lavados em uma gota de 100µL de meio de fertilização (FIV) e duas gotas de 100µL de meio de cultivo. Posteriormente, foram transferidos para gotas de 200µL de meio de cultivo cobertas com óleo mineral, permanecendo por sete dias (D7) a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO₂ e umidade relativa saturada sem condensação. No terceiro dia (D3), metade do meio de cultivo de cada gota foi substituído, como forma de realimentação dos prováveis zigotos e avaliou-se o percentual de estruturas clivadas.

Adição de antioxidantes ao meio de manutenção, envase e simulação de transporte

No D7 do cultivo *in vitro*, os embriões foram avaliados morfológicamente quanto ao estágio de desenvolvimento e qualidade embrionária de acordo com a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), sendo o dia zero (D0) o dia da fertilização *in vitro*.

Os embriões grau I e II em estágio de blastocisto inicial (Bi), blastocisto (Bl) e blastocisto expandido (Bx), foram selecionados e distribuídos aleatoriamente de forma randomizada em três condições de meio de manutenção: Controle (C: meio de manutenção), Melatonina (M: meio de manutenção + melatonina a 10^{-9} M) e Resveratrol (R: meio de manutenção + resveratrol 0,5µM).

Os antioxidantes (melatonina e resveratrol) armazenados em temperatura inferior a 0°C em soluções stock, foram adicionados ao meio de manutenção no dia do envase. Após serem descongelados com o auxílio da placa aquecedora a 36°C, foram adicionados

ao meio na seguinte proporção: 1 μ L de solução stock de antioxidante + 999 μ L de meio de manutenção.

Os embriões foram envasados em palhetas de 0,25mL, vedadas com lacre e mantidas a 36°C em transportadora de embriões (TREO, WTA - Watanabe Tecnologia Aplicada, Cravinhos, SP, BR) por 6, 9 e 12 horas, totalizando desta forma, nove tratamentos.

Desenvase, recultivo e avaliações

Transcorrido o tempo determinado conforme o tratamento, as palhetas foram retiradas da transportadora, com posterior desenvase e recultivo individual dos embriões em gotas de 25 μ L de meio de cultivo cobertas por óleo mineral e incubadas em estufa a 38,5 °C e atmosfera de 5% de CO₂, durante período de 72 horas após o envase (Figura 1).

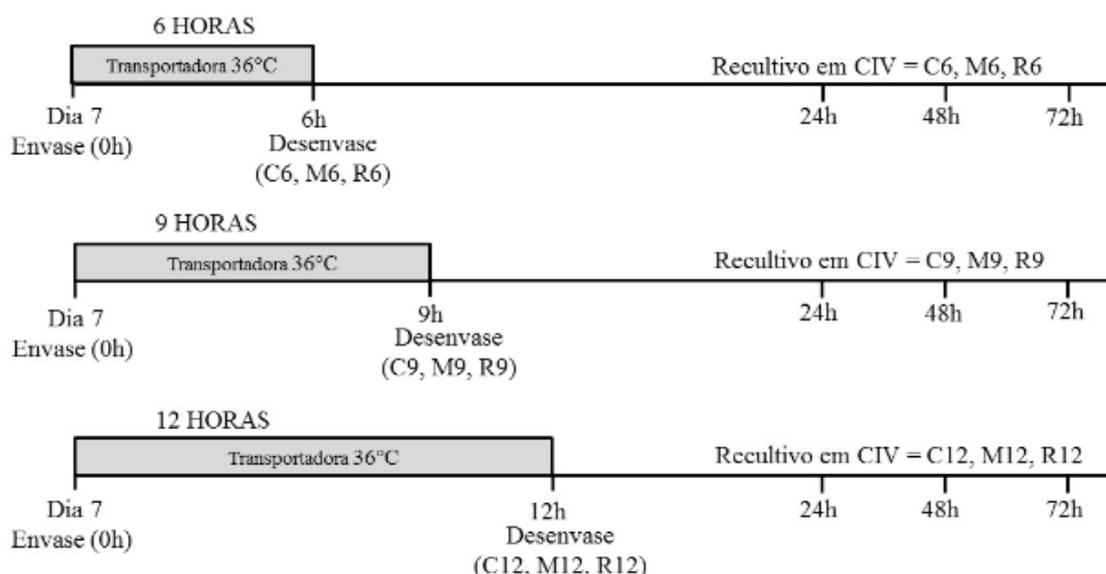


Figura 1. Período de recultivo dos embriões após o desenvase de cada tratamento.

Os embriões foram avaliados no momento do desenvase e após 24, 48 e 72 horas pós envase em recultivo, quanto ao desenvolvimento e qualidade morfológica segundo classificação da IETS.

Delineamento Experimental e análises estatísticas

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com arranjo fatorial 3x3, sendo três condições de meio de manutenção e três tempos de simulação de transporte. Dessa forma, foram definidos os nove tratamentos: Controle (C6, C9, C12), Melatonina (M6, M9, M12) e Resveratrol (R6, R9, R12) (Figura 2).

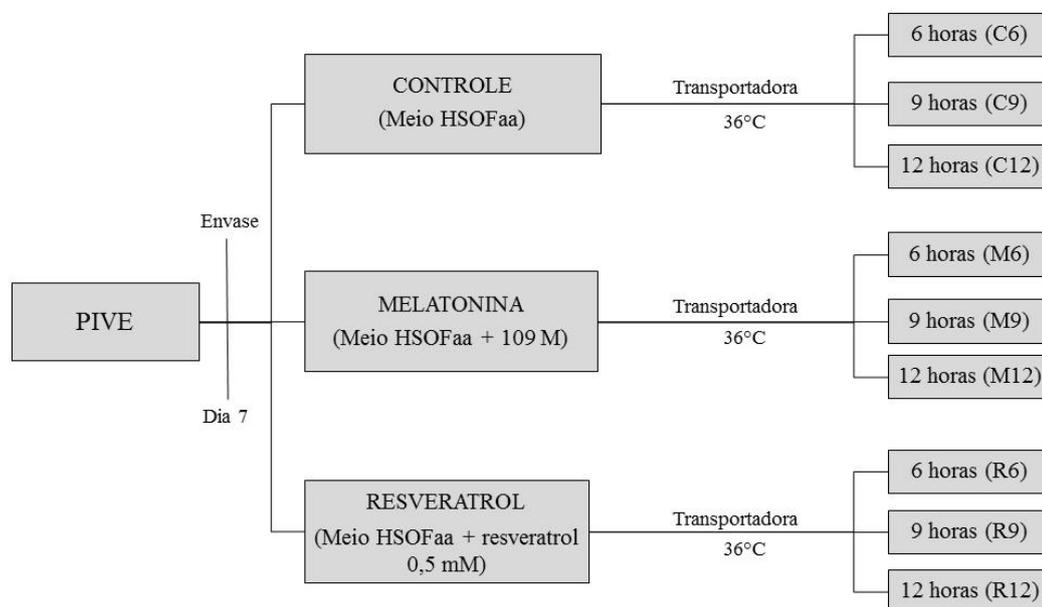


Figura 2. Definição dos tratamentos após a produção *in vitro* de embriões.

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa computacional R Project versão 3.5.0, sendo considerado nível de significância de 5% de probabilidade para todos os testes de hipótese utilizados. Foram realizadas análises por dados ordinais utilizando o pacote POLR do programa R, para avaliação dos tratamentos em arranjo fatorial, seus efeitos isolados e suas interações. Em um segundo processo de análises foram considerados nove tratamentos para a avaliação isolada, realizando testes de qui-quadrado.

Resultados

No momento do desenvase, os tratamentos C12 e R12 apresentaram menor percentual de embriões que mantiveram o estágio de desenvolvimento (MAN). Os tratamentos C12, R9, R12, M6, M9 e M12 apresentaram maior percentual de embriões que desenvolveram (DES). Não houve diferença estatística entre os tratamentos para o percentual de embriões que degeneraram (DEG) (Tabela 1).

Tabela 1 - Percentual de embriões que mantiveram o estágio de desenvolvimento (MANT), desenvolveram (DES) e degeneraram (DEG) em função dos tratamentos controle, resveratrol e melatonina em três tempos de simulação de transporte, avaliados no momento do desenvase.

| Meio | Tempo | n | Desenvase | | |
|----------------|-------|----|-----------|---------|---------|
| | | | MANT (%) | DES (%) | DEG (%) |
| Controle | 6h | 80 | 78,75 a | 21,25 b | 0,00 a |
| | 9h | 77 | 70,13 a | 28,57 b | 1,30 a |
| | 12h | 78 | 52,56 b | 47,44 a | 0,00 a |
| Resveratrol | 6h | 79 | 74,68 a | 25,32 b | 0,00 a |
| | 9h | 80 | 66,25 a | 33,75 a | 0,00 a |
| | 12h | 91 | 59,34 b | 39,56 a | 1,10 a |
| Melatonina | 6h | 84 | 66,67 a | 32,14 a | 1,19 a |
| | 9h | 91 | 64,84 a | 32,97 a | 2,20 a |
| | 12h | 88 | 65,91 a | 34,09 a | 0,00 a |
| P valor | | | 0,0278 | 0,0298 | 0,5377 |

Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Na avaliação 24 horas após o envase, o tratamento R6 apresentou menor percentual de embriões que mantiveram o estágio de desenvolvimento. Já os percentuais de embriões que desenvolveram não foram influenciados pelos tratamentos. E o tratamento C12 apresentou menor percentual de embriões degenerados (Tabela 2).

Tabela 2 – Percentual de embriões que mantiveram o estágio de desenvolvimento (MANT), desenvolveram (DES) e degeneraram (DEG) em função dos tratamentos controle, resveratrol e melatonina em três tempos de simulação de transporte, avaliados 24 horas após o envase.

| Meio | Tempo | n | 24 horas | | |
|----------------|-------|----|----------|---------|---------|
| | | | MANT (%) | DES (%) | DEG (%) |
| Controle | 6h | 80 | 27,50 a | 66,25 a | 6,25 a |
| | 9h | 77 | 23,38 a | 67,53 a | 9,09 a |
| | 12h | 78 | 26,92 a | 70,51 a | 2,56 b |
| Resveratrol | 6h | 79 | 15,19 b | 78,48 a | 6,33 a |
| | 9h | 80 | 31,25 a | 65,00 a | 3,75 a |
| | 12h | 91 | 25,27 a | 70,33 a | 4,40 a |
| Melatonina | 6h | 84 | 17,86 a | 69,05 a | 13,10 a |
| | 9h | 91 | 26,37 a | 69,23 a | 4,40 a |
| | 12h | 88 | 31,82 a | 63,64 a | 4,55 a |
| P valor | | | 0,0272 | 0,0532 | 0,0296 |

Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Os percentuais de embriões que mantiveram o estágio de desenvolvimento e que desenvolveram na avaliação 48 horas após o envase, não diferiram em função dos tratamentos. Neste momento de observação, o tratamento C12 e M12 apresentaram menor porcentagem de embriões degenerados (Tabela 3).

Tabela 3 – Percentual de embriões que mantiveram o estágio de desenvolvimento (MANT), desenvolveram (DES) e degeneraram (DEG) em função dos tratamentos controle, resveratrol e melatonina em três tempos de simulação de transporte, avaliados 48 horas após o envase.

| Meio | Tempo | n | 48 horas | | |
|----------------|-------|----|----------|---------|---------|
| | | | MANT (%) | DES (%) | DEG (%) |
| Controle | 6h | 80 | 5,00 a | 78,75 a | 16,25 a |
| | 9h | 77 | 6,49 a | 74,03 a | 19,48 a |
| | 12h | 78 | 8,97 a | 82,05 a | 8,97 b |
| Resveratrol | 6h | 79 | 7,59 a | 79,75 a | 12,66 a |
| | 9h | 80 | 8,75 a | 75,00 a | 16,25 a |
| | 12h | 91 | 9,89 a | 75,82 a | 14,29 a |
| Melatonina | 6h | 84 | 4,76 a | 73,81 a | 21,43 a |
| | 9h | 91 | 13,19 a | 75,82 a | 10,99 a |
| | 12h | 88 | 11,36 a | 79,55 a | 9,09 b |
| P valor | | | 0,5410 | 0,9269 | 0,0408 |

Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

No último momento de avaliação, 72 horas após o envase, não houve diferença estatística entre os percentuais de embriões que mantiveram o estágio de desenvolvimento, desenvolveram ou degeneraram em função dos tratamentos (Tabela 4).

Não houve diferença significativa para o percentual de embriões eclodidos em função dos tratamentos, nas avaliações de 24 horas, 48 horas e 72 horas após o envase. No entanto, no momento do desenvase o tratamento M12 apresentou maior taxa de eclosão em relação C6, R6, M6 e M9 (Tabela 5).

Ao avaliar os estágios de desenvolvimento dos embriões nos momentos do desenvase, 24 horas, 48 horas e 72 horas após o envase, não foi observado efeito dos meios de manutenção e dos tempos de simulação de transporte sobre o desenvolvimento embrionário, bem como das suas interações ($p > 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 4 – Percentual de embriões que mantiveram o estágio de desenvolvimento (MANT), desenvolveram (DES) e degeneraram (DEG) em função dos tratamentos controle, resveratrol e melatonina em três tempos de simulação de transporte, avaliados 72 horas após o envase.

| Meio | Tempo | n | 72 horas | | |
|----------------|-------|----|----------|---------|---------|
| | | | MANT (%) | DES (%) | DEG (%) |
| Controle | 6h | 80 | 2,50 a | 77,50 a | 20,00 a |
| | 9h | 77 | 0,00 a | 71,43 a | 28,57 a |
| | 12h | 78 | 2,56 a | 80,77 a | 16,67 a |
| Resveratrol | 6h | 79 | 2,53 a | 79,75 a | 17,72 a |
| | 9h | 80 | 3,75 a | 72,50 a | 23,75 a |
| | 12h | 91 | 4,40 a | 76,92 a | 18,68 a |
| Melatonina | 6h | 84 | 2,38 a | 67,86 a | 29,76 a |
| | 9h | 91 | 4,40 a | 71,43 a | 24,18 a |
| | 12h | 88 | 2,27 a | 79,55 a | 18,18 a |
| P valor | | | 0,8211 | 0,4869 | 0,3462 |

Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 5 – Percentual de embriões que eclodiram em função dos tratamentos controle, resveratrol e melatonina em três tempos de simulação de transporte, avaliados no momento do desenvase, 24, 48 e 72 horas após o envase.

| Meio | Tempo | n | Momento | | | |
|----------------|-------|----|---------------|--------------|--------------|--------------|
| | | | Desenvase (%) | 24 horas (%) | 48 horas (%) | 72 horas (%) |
| Controle | 6h | 80 | 0,00 bc | 32,50 a | 56,25 a | 68,75 a |
| | 9h | 77 | 5,19 ab | 27,27 a | 59,74 a | 64,94 a |
| | 12h | 78 | 3,84 ab | 28,21 a | 61,54 a | 73,08 a |
| Resveratrol | 6h | 79 | 0,00 bc | 37,97 a | 65,82 a | 73,42 a |
| | 9h | 80 | 2,50 ab | 26,25 a | 57,50 a | 62,50 a |
| | 12h | 91 | 5,49 ab | 29,67 a | 56,04 a | 65,93 a |
| Melatonina | 6h | 84 | 1,19 bc | 38,10 a | 58,33 a | 64,29 a |
| | 9h | 91 | 1,10 bc | 26,37 a | 59,34 a | 63,74 a |
| | 12h | 88 | 9,90 a | 27,27 a | 60,23 a | 69,32 a |
| P valor | | | 0,0473 | ns | ns | ns |

Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 6 – Valores de p-valor para os efeitos do modelo, considerando avaliação multinomial do desenvolvimento do embrião no momento do desenvase, 24 horas, 48 horas e 72 horas após o envase no recultivo.

| Efeitos do modelo | Desenvase | 24 horas | 48 horas | 72 horas |
|-------------------------|-----------|----------|----------|----------|
| Meio de manutenção | 0,3138 | 0,9539 | 0,7766 | 0,947 |
| Tempo de transporte (T) | 0,9936 | 0,7079 | 0,224 | 0,1654 |
| Interação M x T | 0,6443 | 0,2357 | 0,2247 | 0,3466 |

Não foi observada diferença na probabilidade de diferentes estágios de desenvolvimento para os diferentes meios de manutenção e tempos de transporte testados em nenhum momento de avaliação ($p > 0,05$) (Figura 3).

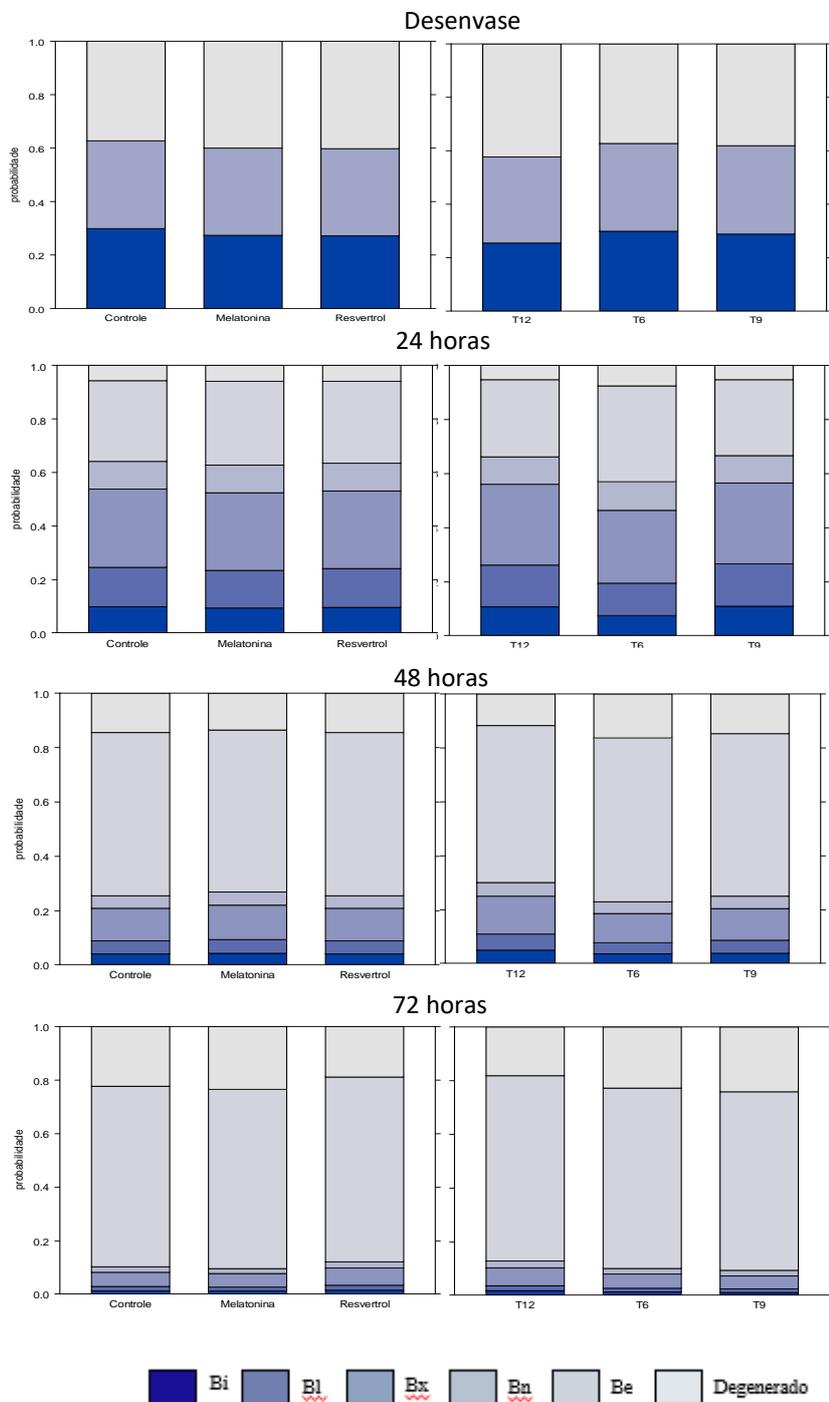


Figura 3. Probabilidade para os diferentes estágios de desenvolvimento considerando meio de manutenção (Controle, Melatonina e Resveratrol) e tempo de simulação de transporte (3, 6 e 12 horas), assumindo análise ordinal dos dados.

Os meios de manutenção (controle, melatonina 10^{-9} M e resveratrol $0,5 \mu\text{M}$) e os tempos de simulação de transporte (6 horas, 9 horas e 12 horas) e suas interações não influenciaram ($p > 0,05$) na qualidade dos embriões nos momentos de observações de desenvase, 24 horas, 48 horas e 72 horas após envase (Tabela 7).

Tabela 7 – Valores de p-valor para os efeitos do modelo, considerando avaliação multinomial da qualidade dos embriões no momento do desenvase, 24 horas, 48 horas e 72 horas após o envase.

| Efeitos do modelo | Desenvase | 24 horas | 48 horas | 72 horas |
|--------------------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Meio de manutenção (M) | 0,9371 | 0,1277 | 0,4622 | 0,3434 |
| Tempo de transporte (T) | 0,7148 | 0,4728 | 0,4545 | 0,4888 |
| Interação MxT | 0,6995 | 0,0891 | 0,5385 | 0,5358 |

Os diferentes meios de manutenção (controle, melatonina 10^{-9} M e resveratrol $0,5 \mu\text{M}$) e os diferentes tempos de simulação de transporte (6, 9 e 12 horas) não proporcionaram diferenças significativas ($p > 0,05$) na probabilidade de scores de qualidade em nenhum dos momentos avaliados (Figura 4).

A Tabela 8 apresenta os percentuais de embriões que eclodiram ou degeneraram na avaliação 48 horas e 72 horas de recultivo em função do estágio de desenvolvimento (Bi, B1 e Bx) no momento do envase e o tempo de simulação de transporte (6 horas, 9 horas e 12 horas).

Os diferentes tempos de simulação de transporte (6 horas, 9 horas e 12 horas), não influenciaram no percentual de degeneração ou eclosão independente do estágio de desenvolvimento no momento do envase ($p > 0,05$) nas avaliações 48 horas e 72 horas de recultivo pós envase.

As taxas de eclosões nas avaliações de 48 horas e 72 horas de recultivo, independentemente do tempo de simulação de transporte, apresentaram diferenças estatísticas em função do estágio de desenvolvimento no momento do envase. Os embriões envasados no estágio Bx tiveram maiores taxas de eclosão em relação aos embriões envasados no estágio B1 que por sua vez apresentou maiores taxas de eclosão em relação aos Bi ($p < 0,05$).

Embriões envasados no estágio Bx também apresentaram menores taxas de degeneração em relação aos embriões envasados nos estágios B1, e embriões no estágio Bi apresentaram as maiores taxas de degeneração, independentemente do tempo de simulação de transporte, nas avaliações de recultivo de 48 horas e 72 horas ($p < 0,05$).

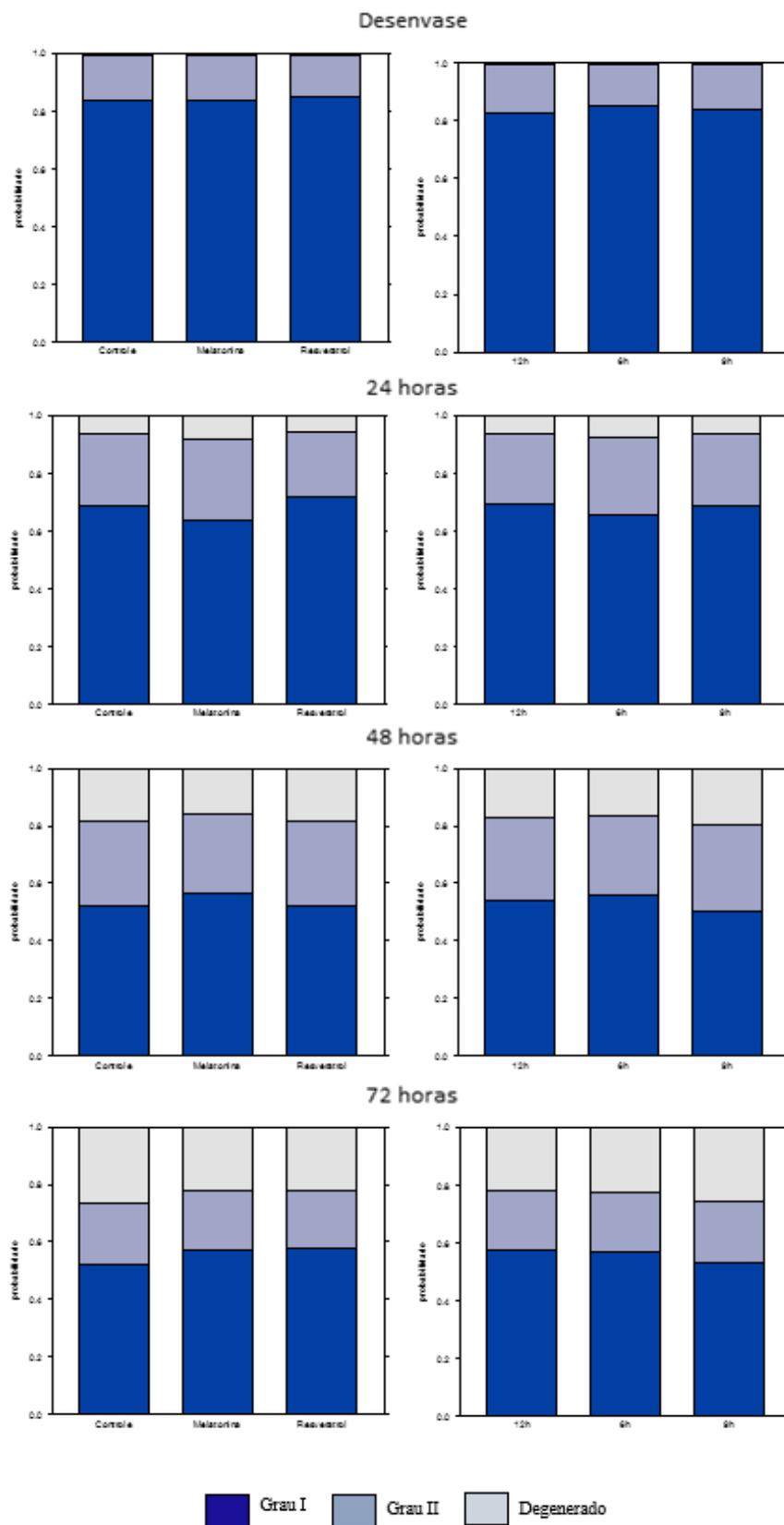


Figura 4. Probabilidade dos scores de qualidade dos embriões considerando meio de manutenção (Controle, Melatonina e Resveratrol) e tempo de simulação de transporte (6, 9 e 12 horas), assumindo análise ordinal dos dados.

Tabela 8 – Percentual de embriões que eclodiram (ECLO) e degeneraram (DEG) em função do estágio de desenvolvimento no momento do envase (Bi, B1 e Bx) e do tempo de simulação de transporte (6, 9 e 12 horas), avaliados 48 e 72 horas após o envase.

| Estágio | Tempo | Envase | | 48 horas | | 72 horas | |
|---------|-------|--------|----------|----------|----------|----------|--|
| | | n | ECLO (%) | DEG (%) | ECLO (%) | DEG (%) | |
| Bi | 6h | 77 | 26,00 c | 33,80 a | 41,60 c | 41,60 c | |
| | 9h | 68 | 19,10 c | 32,40 a | 25,00 c | 52,90 c | |
| | 12h | 66 | 27,30 c | 21,20 a | 45,50 c | 34,80 c | |
| B1 | 6h | 72 | 61,10 b | 12,50 b | 69,40 b | 20,80 b | |
| | 9h | 90 | 66,70 b | 12,20 bd | 67,80 b | 23,30 b | |
| | 12h | 80 | 62,50 b | 8,80 be | 72,50 bd | 16,30 bd | |
| Bx | 6h | 94 | 86,20 a | 6,40 c | 89,40 a | 8,50 a | |
| | 9h | 90 | 83,30 a | 5,60 cd | 90,00 a | 6,70 a | |
| | 12h | 108 | 76,90 a | 6,50 ce | 81,50 ad | 9,30 ad | |

Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Discussão

No presente estudo, embriões do tratamento controle (C12) e resveratrol (R12) com 12 horas de simulação de transporte apresentaram menores taxas de manutenção do estágio de desenvolvimento no momento de desenvase. Este comportamento já era esperado, uma vez que o maior tempo de manutenção do embrião na transportadora, propiciou a continuidade do seu desenvolvimento. No entanto, não foi observado quando o meio foi suplementado de melatonina, sugerindo uma possível influência da melatonina em retardar o desenvolvimento do embrião durante o período de transporte.

Somente no momento de desenvase observou-se diferença no percentual de desenvolvimento dos embriões nos diferentes tratamentos, independentemente do antioxidante ou tempo de simulação de transporte. Nos demais momentos de avaliação estas diferenças não foram significativas. Este comportamento pode estar relacionado a um retardo na retomada de desenvolvimento nos tratamentos C6, C9 e R6 no momento do desenvase, que não comprometeu as fases subsequentes de desenvolvimento no recultivo.

Os demais resultados apresentados, demonstram que no presente estudo o tempo de simulação de transporte e a adição de antioxidantes ao meio de manutenção não interferiram na qualidade e viabilidade embrionária. Os poucos resultados não correlacionam com a hipótese de efeitos benéficos dos antioxidantes na proteção dos embriões durante a simulação de transporte.

Na avaliação de 24 horas após o envase, o tratamento controle mantido por 12 horas na simulação de transporte apresentou menor taxa de embriões degenerados, entende-se que o maior tempo de envase não comprometeu a viabilidade dos embriões com 24 horas de recultivo, mesmo sem adição de antioxidante.

Resultados semelhantes foram encontrados por Ramos et al. (2006) simulando o tempo de transporte por 6 e 12 horas em transportadora sem perda da viabilidade embrionária. Os autores relataram taxas de eclosão e degeneração no tempo de 6 horas de simulação de transporte de 81,3% e 0% respectivamente, e no tempo de 12 horas de simulação de transporte as taxas de eclosão e degeneração foram 92% e 3,6% respectivamente.

Diversos estudos mencionam resultados divergentes, sendo que melhores taxas de desenvolvimento embrionário foram observadas por Silva (2015), quando adicionou resveratrol ao meio de manutenção e simulou dois tempos de transporte (6 e 10 horas). Na avaliação com 24 horas de recultivo, os autores observaram que o tratamento com adição de resveratrol mantido por 10 horas de simulação de transporte resultou em maior taxa de desenvolvimento (80,4%) em relação ao controle (62%). Quanto a taxa de eclosão, os resultados do estudo corroboraram com o do presente trabalho, não apresentando diferença em função dos meios e tempos de transporte, e ambos com taxas de eclosão ao desovase e 6 horas de simulação de transporte de 0%. A taxa de degeneração relatada pelo autor também não foi influenciada pelos tratamentos. No entanto, quando comparada com a do presente estudo foram mais elevadas, podendo sugerir pior qualidade dos embriões.

Mukherjee et al. (2014) verificaram cinco concentrações diferentes de resveratrol em meio de maturação e relataram que as concentrações de 0,25 e 0,5 μ M proporcionaram efeitos benéficos, estimulando o desenvolvimento embrionário. Salzano et al. (2014), também avaliando as concentrações ideais de resveratrol, porém em meio de cultivo após a vitrificação, observaram que a concentração de 0,5 μ M proporcionou maiores taxas de desenvolvimento comparado com o controle (67,3% e 50,3% respectivamente) e maiores taxas de eclosão (58,9% e 30,9% respectivamente), na avaliação após 48 horas de recultivo. Ambos os estudos apontaram a concentração ideal semelhante a utilizada neste trabalho, porém, diferenças nas taxas de desenvolvimento e eclosão no momento de avaliação de 48 horas não foram observadas.

Assim como o resveratrol, estudos indicam que a melatonina adicionada ao meio de cultivo promove aumento das taxas de clivagem e blastocistos de embriões bovinos

(Marques et al., 2018). Entretanto, ao utilizar a mesma concentração de melatonina citada pelo autor, no meio de manutenção não foram observadas diferenças, não mostrando melhora na viabilidade e desenvolvimento dos embriões.

Porém, estudos conduzidos por Chequeman et al. (2014), não demonstraram diferenças estatísticas no desenvolvimento embrionário quando utilizaram doses de 0,01 e 0,1mmol de melatonina no meio de fertilização, corroborando com os resultados obtidos no presente estudo.

Na avaliação com 72 horas de recultivo, não houve diferença entre os tratamentos para a taxa de degeneração e eclosão. Estes resultados podem evidenciar que talvez não houve desafio suficiente para propiciar o efeito benéfico dos antioxidantes na manutenção da viabilidade embrionária.

Neste trabalho, os embriões sofreram certo grau de desafio por serem cultivados em alto nível de oxigênio, no entanto, não foi adicionado SFB ao meio de maturação. Possivelmente, esta ausência proporcionou melhor qualidade, pelo menor acúmulo de lipídeos, e conseqüentemente, a menor susceptibilidade a peroxidação.

Diversos fatores podem interferir na evidenciação dos efeitos benéficos dos antioxidantes na proteção embrionária ao estresse oxidativo. Segundo Cruz et al. (2014), a eficácia da adição da melatonina ao meio CIV, é dependente das condições de cultivo. Papis et al. (2007) demonstraram que em cultivos com altas concentrações de oxigênio (>20%), a administração da melatonina em curtos períodos de tempo foi capaz de reverter efeitos tóxicos das EROS, por outro lado, a adição em condições ideais (<7% de concentração de oxigênio) promoveu a redução na produção de blastocistos.

O acúmulo de lipídeos no citoplasma do embrião *in vitro* predispõe a maior sensibilidade ao estresse oxidativo (Ambruosi et al., 2009). Sabe-se que a adição do SFB aos meios de PIVE oferece muitos componentes essenciais para o bom desenvolvimento do embrião, como aminoácidos, vitaminas e substrato energético. Porém, seu uso está associado com as alterações metabólicas e acúmulo excessivo de lipídeos (Mucci et al., 2006).

Barceló-Fimbres e Seidel Jr (2007) afirmaram que é possível a produção de embriões *in vitro* com a ausência do SFB sem que afete radicalmente a produção dos embriões, bem como a qualidade.

Os resultados do presente trabalho evidenciaram também, que o intervalo máximo de simulação de transporte não foi suficiente para promover perda na viabilidade dos embriões.

Sendo assim, essas circunstâncias podem explicar o fato das adições do resveratrol e da melatonina ao meio de manutenção não terem se mostrado eficientes sobre a viabilidade dos embriões produzidos *in vitro* após simulação de transporte. Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de mais estudos para avaliar a eficiência do resveratrol e da melatonina no meio de manutenção, em embriões produzidos *in vitro* em situações de desafios mais acentuados.

Como não houve efeito do meio no desenvolvimento e qualidade embrionária, avaliou-se o efeito do tempo de transporte sobre a viabilidade dos embriões envasados em diferentes estágios (Bi, Bl e Bx).

No presente estudo, embriões com estágio de desenvolvimento mais avançado apresentaram maiores taxas de eclosão e menores taxas de degeneração em relação aos embriões envasados em estágios mais iniciais, independentemente do tempo de simulação de transporte.

Resultados parecidos foram relatados por Pacheco et al. (2018), quando avaliaram a taxa de prenhez de vacas de corte e leite em função do estágio de desenvolvimento dos embriões *in vitro* no momento da transferência. Os autores obtiveram taxas de prenhez de 51%, 42% e 39,5% para os estágios Bx, Bl e Bi, respectivamente, nas vacas de corte. Nas vacas leiteiras as taxas obtidas foram 43%, 40% e 23,5% para os estágios Bx, Bl e Bi, respectivamente. O Bx, quando transferido levou a maior percentual de prenhez em relação aos demais estágios de desenvolvimento. A relação entre o estágio mais avançado de desenvolvimento e maior taxa de prenhez também foi relatada por Silva (2010), em que embriões em estágio Bx apresentaram taxa de prenhez de 44% e embriões no estágio Bl de 32,7%.

Segundo Farin et al. (2004), o estágio de desenvolvimento dos embriões produzidos *in vitro*, no sétimo dia é um indicativo de qualidade, visto que os estágios mais avançados apresentaram maior taxa de prenhez por causa de suas maiores atividades e qualidades superiores.

Entretanto, existe um indicativo que embriões em estágios muito desenvolvidos (Blastocisto eclodido) ou em estágios muito atrasados (Mórula), apresentam menor taxa de prenhez em relação aos demais estágios de desenvolvimento (Jainudeen et al., 2004).

Em conclusão, a adição de melatonina e resveratrol ao meio de manutenção não proporcionou melhora na qualidade e viabilidade de embriões bovinos produzidos *in vitro* em simulação de transporte a 36°C por até 12 horas. Embriões envasados no estágio Bx, independentemente do tempo de simulação de transporte, apresentaram maior viabilidade

que embriões BI e Bi, tendo como indicativo maior taxa de eclosão e menor taxa de degeneração no recultivo.

Referências

Agarwal A, Said TM, Bedaiwy MA, Banerjee J, Alvarez JG. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertility and Sterility* 2006; 86:503-512.

Ambrosi B, Lacalandra GM, Iorga AI, De Santis T, Mugnier S, Matarrese R, Goudet, G, Dell'Aquila ME. Cytoplasmic lipid droplets and mitochondrial distribution in equine oocytes: Implications on oocyte maturation, fertilization and developmental competence after ICSI. *Theriogenology* 2009; 71:1093–1104.

Anisimov VN, Popovich IG, Zabezhinski MA, Anisimov SV, Vesnushkin GM, Vinogradova IA. Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 2006; 1757:573-589.

Barceló-Fimbres M, Seidel Jr GE. Effects of fetal calf serum, phenazine ethosulfate and either glucose or fructose during in vitro culture of bovine embryos on embryonic development after cryopreservation. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research* 2007; 74(11):1395-1405.

Bertelli AA, Das DK. Grapes, wines, resveratrol, and heart health. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009; 54:468-76.

Chequeman C, Arias ME, Risopatron J, Felmer R, Alvarez J, Mogas T, Sanchez R. Supplementation of IVF medium with melatonin: effect on sperm functionality and in vitro produced bovine embryos. *Andrologia* 2015; 47(6):604-615.

Combelles CM, Gupta S, Agarwal A. Could oxidative stress influence the in vitro maturation of oocytes? *Reproductive biomedicine online* 2009; 18(6):864-880.

Cruz MHC, Leal CLV, da Cruz JF, Tan DX, Reiter RJ. Role of melatonin on production and preservation of gametes and embryos: a brief review. *Animal Reproduction Science* 2014; 145 (3-4):150-160.

Farin CE, Farin PW, Piedrahita JA. Development of fetuses from in vitro - produced and cloned bovine embryos. *Journal of Animal Science* 2004; 82:53-62.

Gupta MK, Uhm SJ, Lee HT. Effect of vitrification and beta-mercaptoethanol on reactive oxygen species activity and in vitro development of oocytes vitrified before or after in vitro fertilization. *Fertility and sterility* 2010; 93:2602-2607.

Hosseini SM, Forouzanfar M, Hajian M, Asgari V, Abedi P, Hosseini L, Ostadhosseini S, Moulavi F, Langroodi MS, Sadeghi H, Bahramian H, Eghbalsaied Sh, Nasr-Esfahani MH. Antioxidant supplementation of culture medium during embryo development and/or after vitrification-warming; which is the most important? *Journal of assisted reproduction and genetics* 2009; 26:355-364.

Jainudeen MR, Wahid H, Hafez ESE. Indução da ovulação, Produção e Transferência de Embriões. In: HAFEZ, ESE; HAFEZ, B. Reprodução Animal. 7ª ed. São Paulo: Ed Manole; 2004. p.409-434.

Khan SN, Shaeib F, Najafi T, Kavdia M, Gonik B, Saed GM, Goud PT, Abu-Soud HM. Diffused intra-oocyte hydrogen peroxide activates myeloperoxidase and deteriorates oocyte quality. PloS one 2015; 10:0132388.

Kwak SS, Cheong SA, Jeon Y, Lee E, Choi KC, Jeung EB, Hyun SH. The effects of resveratrol on porcine oocyte *in vitro* maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and in vitro fertilization. Theriogenology 2012; 78:86-101.

Li Y, Zhang Z, He C, Zhu K, Xu Z, Ma T, Tao J, Liu G. Melatonin protects porcine oocyte in vitro maturation from heat stress. Journal of pineal research 2015; 59:365-375.

Manjunatha BM, Devaraj M, Gupta PSP, Ravindra JP, Nandi S. Effect of taurine and melatonin in the culture medium on buffalo in vitro embryo development. Reproduction in domestic animals 2009; 44:12-16.

Marinho LSR, Untura RM, Morotti F, Moino LL, Rigo AG, Sanches BV, Pontes JHF, Seneda MM. Large-scale programs for recipients of in vitro-produced embryos. Animal Reproduction 2012; 9:323-28.

Marques TC, Da Silva Santos EC, Diesel TO, Leme LO, Martins CF, Dode MAN, Alves BG, Costa FPH, De Oliveira EB, Gambarini ML. Melatonin reduces apoptotic cells, SOD2 and HSPB1 and improves the in vitro production and quality of bovine blastocysts. Reproduction in Domestic Animals 2018; 53(1):226-236.

Mehaisen GM, Saeed AM, Gad A, Abass AO, Arafa M, El-Sayed A. Antioxidant capacity of melatonin on preimplantation development of fresh and vitrified rabbit embryos: Morphological and molecular aspects. PloS one 2015, 10:e0139814.

Mucci N, Aller J, Kaiser GG, Hozbor F, Cabodevila J, Alberio RH. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. Theriogenology 2006; 65:1551-1562.

Mukherjee A, Malik H, Saha AP, Dubey A, Singhal DK, Boateng S, Saugandhika S, Kumar S, De S, Guha SK, Malakar D. Resveratrol treatment during goat oocytes maturation enhances developmental competence of parthenogenetic and hand-made cloned blastocysts by modulating intracellular glutathione level and embryonic gene expression. Journal of assisted reproduction and genetics 2014; 31:229-239.

Pacheco SL, Hoppen AR, De Souza Rosa F. Comparação da taxa de prenhez conforme o estágio de desenvolvimento de embriões produzidos in vitro e transferidos em bovinos de corte e leite. Revista de Ciências Agroveterinárias e Alimentos 2018; 2.

Papis K, Poleszczuk O, Wenta-Muchalska E, Modlinski JA. Melatonin effect in bovine embryo development in vitro in relation to oxygen concentration. J Pineal Res 2007; 43:321–326.

Parrish JJ, Krogenaes A, Susko-Parrish JL. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology* 1995; 44:859-869.

Ramos AA, Polisseni J, de Sá WF, Ferreira AM, Camargo LSA, Folhadella DS, Nogueira LAG. Efeito do transporte no desenvolvimento de embriões bovinos cultivados in vitro a fresco ou reaquecidos após vitrificação. *Revista Brasileira Zootecnia* 2006; 35(6):2285-2289.

Reiter RJ, Rosales-Corral SA, Manchester LC, Tan DX. Peripheral reproductive organ health and melatonin: ready for prime time. *Int J Mol Sci* 2013; 14:7231–7272.

Ren L, Wang Z, An L, Zhang Z, Tan K, Miao K, Tao L, Cheng L, Zhang Z, Yang M, Wu Z, Tian J. Dynamic comparisons of high-resolution expression profiles highlighting mitochondria-related genes between in vivo and in vitro fertilized early mouse embryos. *Human Reproduction* 2015; 30:2892-2911.

Salzano A, Albero G, Zullo G, Neglia G, Abdel-Wahab A, Bifulco G, Zicarelli L, Gasparrini B. Effect of resveratrol supplementation during culture on the quality and cryotolerance of bovine in vitro produced embryos. *Animal Reproduction Science* 2014; 151:91-96.

Silva ARN. Efeito do resveratrol na qualidade e desenvolvimento de embriões bovinos criopreservados ou conservados em meio holding. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2015.

Silva LA. Taxa de gestação e mortalidade embrionária em receptoras de embriões produzidos in vitro, após sincronização do estro com diferentes protocolos hormonais. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Belo Horizonte. 2010.

Siu AW, Maldonado M, Sanchez-Hidalgo M, Tan DX, Reiter RJ. Protective effects of melatonin in experimental free radical-related ocular diseases. *Journal of pineal research* 2006; 40:101-109.

Stinshoff H, Wilkening S, Hanstedt A, Brüning K, Wrenzycki C. Cryopreservation affects the quality of in vitro produced bovine embryos at the molecular level. *Theriogenology* 2011, 76:1433-1441.

Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Gonçalves PB, Wolf E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biology of reproduction* 2001; 64:904-909.

Tian X, Wang F, He C, Zhang L, Tan D, Reiter RJ, Xu J, Ji P, Liu G. Beneficial effects of melatonin on bovine oocytes maturation: a mechanistic approach. *Journal of pineal research* 2014; 57:239-247.

Vázquez MI, Abecia JA, Forcada F, Casao A. Effects of exogenous melatonin on in vivo embryo viability and oocyte competence of undernourished ewes after weaning during the seasonal anestrus. *Theriogenology* 2010; 74:618-626.

Wang F, Tian X, Zhang L, Gao C, He C, Fu Y, Ji P, Li Y, Li N, Liu G. Beneficial effects of melatonin on in vitro bovine embryonic development are mediated by melatonin receptor 1. *Journal of pineal research* 2014; 56:333-342.

Zhao XM, Hao HS, Du WH, Zhao SJ, Wang HY, Wang N, Wang D, Liu Y, Qin T, Zhu HB. Melatonin inhibits apoptosis and improves the developmental potential of vitrified bovine oocytes. *Journal of pineal research* 2016; 60:132-141.