

MARIA ANGÉLICA VALENTE QUINTÃO

**USO DE ANTIOXIDANTES NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS:
TAXA DE CONVERSÃO E SOBREVIVÊNCIA EMBRIONÁRIA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: José Domingos Guimarães

Coorientadora: Simone Eliza F. Guimarães

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

Q7u
2023

Quintão, Maria Angélica Valente, 1969-

Uso de antioxidantes na produção *in vitro* de embriões
bovinos: taxa de conversão e sobrevivência embrionária / Maria
Angélica Valente Quintão. – Viçosa, MG, 2023.

1 dissertação eletrônica (51 f.): il.

Orientador: José Domingos Guimarães.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Veterinária, 2023.

Referências bibliográficas: f. 46-51.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.353>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Bovinos - Embriões - Criopreservação. 2. Antioxidantes.
3. Análise de sobrevivência (Biometria). I. Guimarães, José
Domingos, 1963-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária. III. Título.

CDD 22. ed. 636.20821


MARIA ANGÉLICA VALENTE QUINTÃO

**USO DE ANTIOXIDANTES NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS:
TAXA DE CONVERSÃO E SOBREVIVÊNCIA EMBRIONÁRIA**


Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de fevereiro de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 MARIA ANGELICA QUINTAO BARROS
Data: 12/06/2023 10:58:52-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Maria Angélica Valente Quintão
Autora

Documento assinado digitalmente
 JOSE DOMINGOS GUIMARAES
Data: 19/06/2023 12:56:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

José Domingos Guimarães
Orientador

Aos meus pais e irmãos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que abençoa todos os meus projetos.

Aos meus queridos pais João Batista Sobreira Quintão e Maria Imaculada da Conceição Valente Quintão, minha inspiração, meus exemplos de sabedoria, fé e aconchego.

Ao meu esposo João Nilson Pinto de Barros, pelo companheirismo, força, compreensão, pelo apoio incondicional.

Aos meus filhos Maria Eduarda, João Nilson e José Guilherme, meus eternos amores, razão de todo meu viver.

A toda minha família, meus irmãos Claudia e Egídio, meus sobrinhos Rayane e Antônio, meus cunhados Stefania e Reginaldo.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

Ao meu orientador Jose Domingos Guimarães que me conduziu na realização deste trabalho, pela competência, oportunidade e confiança. A minha co-orientadora Simone Eliza Facioni Guimarães e a todos os professores os quais tive disciplina.

A todos os meus colegas e ex-colegas da pós-graduação, em especial a Wasin el Shebli, por todas as contribuições;

Aos órgãos de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e Fundação de amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais - FAPEMIG.

“O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos dia após dia.”

(Robert Collier)

RESUMO

BARROS, Maria Angélica Quintão, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2023. **Uso de Antioxidantes na Produção *in vitro* de Embriões Bovinos: Taxa de Conversão e Sobrevivência Embrionária.** Orientador: José Domingos Guimarães. Coorientadora: Simone Eliza Facioni Guimarães.

Adição de antioxidantes ao meio de maturação e de cultivo de embriões indica que os mesmos contribuem de forma benéfica nas taxas de produção de embriões e sobrevivência dos mesmos aos métodos convencionais de criopreservação. Na tentativa de melhorar as taxas de produção e sobrevivência à criopreservação, vitrificação e congelamento lento, os antioxidantes Vitamina C e o Ácido Hialurônico foram adicionados ao meio de maturação e de cultivo *in vitro* de embriões individualmente ou associados. No Experimento 1: avaliação do efeito da adição de vitamina C, de ácido hialurônico e de vitamina C associada ao ácido hialurônico sobre a produção e qualidade de embriões (taxa de conversão) produzidos *in vitro*. Não houve diferença na taxa de conversão ou total de embriões produzidos do grupo controle (meio sem adição de antioxidante) com os grupos de tratamentos ($P > 0,05$). No Experimento 2: avaliar o efeito dos métodos de congelamento lento e da vitrificação sobre a viabilidade (taxa de sobrevivência) de embriões cultivados em meios de maturação e cultivo, suplementados com antioxidantes nos diferentes grupos experimentais. Houve diferença na sobrevivência dos embriões vitrificados após aquecimento dos embriões por 48 horas de incubação em estufa com 5 % de CO₂ a 38,5 °C, mas até 24 horas após o aquecimento, a taxa de sobrevivência embrionária não se mostrou diferente entre os valores obtidos nos diferentes tratamentos ($P > 0,05$). que a adição dos antioxidantes ácido hialurônico (0,5 mg/mL) e vitamina C (50 µg/mL), individualmente ou associados não influencia a produção *in vitro* total de embriões, porém, se mostram relacionados a maior quantidade de embriões nos estádios de desenvolvimento de blastocistos expandidos, blastocistos em eclosão e blastocistos eclodidos; De acordo com a metodologias empregadas para criopreservação de embriões, a vitrificação apresenta vantagens ao congelamento lento; A taxa de sobrevivência dos embriões pós-descongelamento não é influenciada pela adição de antioxidantes no meio de maturação e de cultivo de embriões submetidos ao método de congelamento lento; Houve diferença significativa no grupo de embriões produzidos em meios de

maturação e cultivo com adição de ácido hialurônico, na taxa de sobrevivência dos embriões criopreservados pelo método de vitrificação.

Palavras-chave: PIVE. Criopreservação. Antioxidantes. ROS. Viabilidade embrionária.

ABSTRACT

BARROS, Maria Angélica Quintão, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa. February, 2023. **Use of Antioxidants in in Vitro Production of Bovine Embryos: Conversion Rate and Embryo Survival.** Advisor: José Domingos Guimarães. Co-advisor: Simone Eliza Facioni Guimarães.

The addition of antioxidants to the embryo maturation and culture medium indicates that they contribute in a beneficial way to the embryo production rates and their survival to conventional methods of cryopreservation. In an attempt to improve the production and survival rates of cryopreservation, vitrification and slow freezing, the antioxidants Vitamin C and Hyaluronic Acid were added to the maturation medium and in vitro culture of embryos individually or associated. In Experiment 1: evaluation of the effect of adding vitamin C, hyaluronic acid and vitamin C + hyaluronic acid on the production and quality of embryos produced in vitro, there was no significant difference between the control group (medium without addition of antioxidant) and treatment groups in terms of the number of embryos produced. In Experiment 2: to evaluate the effect of vitrification on the viability of embryos cultured in maturation and culture medium added with antioxidants in the different experimental groups. There was a difference in the survival of the vitrified embryos after heating the embryos for 48 hours of incubation in an incubator with 5% CO₂ at 38.5 °C, but up to 24 hours after heating, the embryonic survival rate was not different between the values obtained in the different treatments ($P>0.05$). that the addition of antioxidants hyaluronic acid (0.5 mg/mL) and vitamin C (50 µg/mL), individually or associated, does not influence the total in vitro production of embryos, however, they are related to a greater number of embryos in the stages of development of expanded blastocysts, hatching blastocysts and hatched blastocysts; According to the methodologies employed for cryopreservation of embryos, vitrification has advantages over slow freezing; The survival rate of post-thawing embryos is not influenced by the addition of antioxidants in the maturation and culture medium of embryos submitted to the slow freezing method; There was a significant difference in the group of embryos produced in maturation and culture media with the addition of hyaluronic acid, in the survival rate of embryos cryopreserved by the vitrification method.

Keywords: PIVE. Cryopreservation. Antioxidants. ROS. Embryonic viability.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema representativo do metabolismo de carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos.....	22
Figura 2: Etapas da oxidação dos ácidos graxos.....	24
Figura 3: Produtos do metabolismo dos aminoácidos (Nelson; Cox, 2011)	25
Figura 4: Reações do ciclo de Krebs (Wikipedia)	26
Figura 5: Representação esquemática da distribuição na palheta de soluções crioprotetoras e embrião para congelamento e transferência direta.....	36
Figura 6: Representação esquemática da palheta de vitrificação.....	37

LISTA DE TABELAS

TAB. 1: Taxa de conversão de oócitos em embriões PIVE, com meios de cultivo suplementados com diferentes agentes antioxidantes40

TAB. 2: Frequências de estruturas embrionárias de bovino produzido *in vitro* -PIVE, em meios de cultivos suplementados com diferentes agentes antioxidantes40

TAB. 3: Taxa de sobrevivência de embriões bovinos pós-desvitrificação e incubados a 38,5 °C, 5 % de CO₂ por 48 horas, de acordo com os diferentes meios de maturação e cultivos suplementados com agentes antioxidantes43

TAB. 4: Taxa de sobrevivência de embriões bovinos após-descongelamento (método de congelamento lento) e incubados a 38,5 °C, 5 % de CO₂ por 48 horas, de acordo com os diferentes meios de maturação e cultivos suplementados com agentes antioxidantes44

TAB. 5: Taxa de sobrevivência de embriões bovinos após-descongelamento (método de congelamento lento e vitrificação) e incubados a 38,5 °C, 5 % de CO₂ por 48 horas, de acordo com os diferentes meios de maturação e cultivos suplementados com agentes antioxidantes45

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADP - Adenosina difosfato

AEMVitC - Alicotas de solução de Estoque de Vitamina C

AMP - Adenosina monofosfato

AMPc – Adenosina monofosfato cíclico

ATMVitC - Alicotas de solução de trabalho de Vitamina C

ATMHA - Solução de trabalho de Ácido Hialurônico (H5388)

ATP - Adenosina trifosfato

Bi - Blastocisto inicial

BI - Blastocisto

Bomba Na⁺/K⁺ - bomba se sódio e potássio

BSA - Albumina sérica bovina

Bx - Blastocisto expandido

°C - Grau Celsius (centígrado)

Ca²⁺ - Íon cálcio

CIV - Cultivo embrionário *in vitro*

CLA - Ácido linoleico conjugado

CoA – coenzima A

COCs – complexo cumulus-oocito

DMSO - dimetilsulfóxido

CO₂ - Dióxido de carbono

DT- Transferência direta

D7- Sétimo dia de cultivo

FAD - Dinucleótido de flavina e adenina

FIV - Fertilização *in vitro*

FSH - Hormônio folículo estimulante

G - Gauge

g – Força centrífuga

h - horas

K⁺ - Íon potássio

LH - Hormônio luteinizante

M - Molar

mg - Miligramas

min - Minutos

MIV - Maturação oocitária *in vitro*

MME – Meio de manutenção de embriões

mL - Mililitro

mm - Milímetro

mM - Milimolar

Na⁺ - Íon sódio

NAD – nicotina adenina dinucleotídeo

NAD⁺ - nicotina adenina dinucleotídeo (oxidado)

NADH - nicotina adenina dinucleotídeo (reduzido)

NADPH - nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

N₂ - Nitrogênio

OPU - Punção folicular guiada por ultrassom

O₂ - Oxigênio

PBS - Tampão salina fosfato

pH - Concentração do íon hidrogênio

PHE - Penicilina, hipotaurina, epinefrina

PIV - Produção *in vitro*

rpm - Rotações por minuto

SFB - Soro fetal bovino

SOF - Fluido sintético de oviduto

TAG - Triacilgliceróis

TCM - 199 – “Tissue culture médium 199”

UI - Unidades internacionais

μ - Micro

μg - Micrograma

μL - Microlitro

μM - Micromolar

% - Porcentagem

χ² - Qui-quadrado

= - Igual

< - Menor

> - Maior

UI - Unidades internacionais

μ - Micro

μg - Micrograma

μL - Microlitro

μM - Micromolar

/ - Por

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1. Produção in vitro de Embriões Bovinos.....	17
2.2. Metabolismo energético de embriões.....	21
2.2.1. Metabolismo da glicose.....	22
2.2.2. Metabolismo dos ácidos graxos.....	23
2.2.3. Metabolismo dos Aminoácidos.....	25
2.2.4. Ciclo de Krebs e cadeia respiratória.....	25
2.3. A importância dos lipídios na maturação de oócitos e no desenvolvimento embrionário.....	27
2.4. Uso de antioxidantes na produção de embriões.....	28
2.4.1 – Ácido Ascórbico ou Vitamina C.....	29
2.4.2 – Ácido Hialurônico (AH).....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1. Produção in vitro de embriões.....	31
3.1.1. Coleta de oócitos.....	31
3.1.2. Preparo das alíquotas de estoque - AEVitC e de alíquotas de trabalho - ATVitC de Vitamina C, para maturação e para cultivo “in vitro” e de alíquotas de trabalho de Ácido Hialurônico – ATMHA, para maturação “in vitro”.....	31
3.1.2.1. Alíquotas de solução de Estoque de Vitamina C – AEVitC.....	31
3.1.2.2. Alíquotas de solução de trabalho de Vitamina C – ATMVitC.....	32
3.1.2.3. Preparo da solução de trabalho de Ácido Hialurônico (H5388) - ATMHA.....	32
3.1.2.4. Preparo dos tratamentos para maturação in vitro.....	32
3.1.2.5. Preparo das placas para maturação in vitro.....	32
3.1.3. Maturação “in vitro”.....	33
3.1.4. Fertilização “in vitro”.....	33
3.1.4.1. Preparo dos meios para fertilização in vitro – MFIV.....	33
3.1.4.2. Montagem das placas para fertilização in vitro.....	33
3.1.4.3. Preparo do Percoll.....	33
3.1.4.4. Descongelamento do sêmen e seleção espermática.....	33
3.1.5. Cultivo de embriões in vitro.....	34
3.1.5.1. Preparo das alíquotas de trabalho de Ácido Hialurônico (H5388, Sigma) – ATCHA, para cultivo in vitro.....	34
3.1.5.2. Preparo dos tratamentos para cultivo in vitro.....	34
3.1.5.3. Montagem das placas de cultivo in vitro.....	35

3.1.6 Cultivo “in vitro”.....	35
3.2. Congelamento de embriões.....	35
3.2.1. Método de Congelamento lenta de embriões.....	35
3.2.2. Vitrificação de embriões.....	37
3.3. Aquecimento dos embriões vitrificados.....	37
3.3.1. Embriões por congelação lenta.....	37
3.3.2. Embriões vitrificados.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1. Experimento 1: Avaliação do efeito da adição de vitamina C, de ácido hialurônico e de vitamina C + ácido hialurônico sobre a produção e qualidade de embriões produzidos in vitro.....	39
4.2. Experimento 2: Avaliar o efeito dos métodos de vitrificação e de congelamento lento sobre a viabilidade de embriões cultivados em meio de maturação e cultivo adicionado de antioxidantes nos diferentes grupos experimentais.....	41
5. CONCLUSÕES.....	46
REFERÊNCIAS.....	46

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos 20 anos o Brasil sofreu grande transformação no uso e aplicação comercial de biotecnologias da Reprodução, dentre elas, a produção *in vitro* de embriões (Viana, 2018; Gonçalves, 2019).

As biotécnicas reprodutivas possibilitam acelerar a produção de animais de interesse econômico e zootécnico e contribui para a aceleração dos programas de melhoramento genético dos rebanhos de leite e de corte do país, diminuindo o intervalo entre gerações, aumentando a sua produção. Além disso, a PIVE permite otimizar a vida reprodutiva das fêmeas, sendo possível a utilização dos oócitos de fêmeas pré-púberes, vacas gestantes, idosas, e até mesmo de animais com infertilidade adquirida (Gonçalves, et al., 2007; Watanabe et al., 2008).

O congelamento de embriões permite a conservação de embriões (recursos genéticos) por período indeterminado, otimização do uso das receptoras em estro natural por meio de inovulações de embriões criopreservados, e principalmente, facilitar a comercialização dos embriões (importação e exportação). Assim, a criopreservação de embriões tem se tornado parte integrante da reprodução assistida de animais, especialmente de espécies domésticas (Kuleshova; Lopata, 2002). Contudo, a taxa de sucesso a cada etapa do processo de produção *in vitro* são muito baixas, decrescendo a cada etapa da PIV, o que faz com que as taxas de conversão de oócitos em embriões fiquem na faixa de 30 a 45 % e as taxas de embriões em prenhez de 40 a 60 % (Alves, 2019). Na maioria dos estudos revisados, os índices de produção de blastocistos ou taxa de conversão obtidos não ultrapassam a 50 % (Pereira, 2013).

As taxas de sucesso utilizando os métodos de criopreservação de embriões, seja congelamento lento ou pelo método de vitrificação, apresentam grandes oscilações. Entre os fatores limitantes à produção de embriões *in vitro* e o congelamento de embriões está o alto teor lipídico, tanto em oócitos quanto em embriões, que levam ao acúmulo de espécies reativas a oxigênio (ROS) e menor número de blastômeros nos embriões produzidos, quando comparado aos embriões *in vivo*. Concentrações excessivamente altas de ROS podem afetar o equilíbrio da oxi-redução celular e causar danos oxidativos que são prejudiciais ao desenvolvimento de células e embriões. Durante o desenvolvimento embrionário, o estresse oxidativo pode causar bloqueio de desenvolvimento, alteração mitocondrial, dano ao DNA e apoptose (Wang, Zhang, Wang et al., 2017).

Modificações do ambiente de cultivo de embrião, tanto pela redução do ambiente atmosférico (Nakao; Nakatsuji, 1990; Umaoka et al., 1992), ou pela adição de substâncias para reduzir as concentrações de radicais livres são requeridos para o estabelecimento de um sistema de cultivo adequado (De Matos et al., 1995; LUVONI et al., 1996)

O objetivo deste estudo é avaliar se a adição de antioxidantes como o Ácido Hialurônico e a Vitamina C, associados ou não, durante as fases de maturação e de cultivo *in vitro* aumentam a taxa de conversão de oócitos a embriões e à resistência ao processo de criopreservação pelos métodos de congelamento lento (TD) e vitrificação (taxa de sobrevivência).

Palavras-chave: FIV, criopreservação, antioxidantes, ROS, viabilidade embrionária.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Produção *in vitro* de Embriões Bovinos

A produção *in vitro* de embriões compreende três etapas: maturação oocitária, fecundação ou fertilização e cultivo embrionário.

Durante a maturação *in vitro* os oócitos bovinos passam por várias alterações nucleares e citoplasmáticas. Os eventos nucleares incluem: a quebra da vesícula germinativa, o desaparecimento do nucléolo, a condensação da cromatina, a extrusão do primeiro corpúsculo polar e a formação do segundo fuso meiótico (Meinecke et al., 2001). Os eventos citoplasmáticos incluem modificações moleculares (Kubelka et al., 2000), síntese de proteínas (Sirard et al., 1998), redistribuição das organelas intracelulares (Stojkovic et al., 2001) e maturação dos mecanismos de liberação do Ca^{2+} (Wang et al., 2003). Nesta etapa os oócitos adquirem a competência oocitária e a capacidade para serem fecundados, expressando o seu potencial durante o desenvolvimento embrionário inicial (Ferreira et al., 2009). Nos sistemas convencionais de produção *in vitro*, 80 % dos oócitos imaturos completam a metáfase II da meiose II (Dominko; First, 1997), no entanto, aproximadamente 40 % dos oócitos fertilizados alcançam o estágio de blastocisto (Ward et al., 2002; Sirard et al., 2006).

Na fertilização *in vitro*, os oócitos são incubados com os espermatozoides por um período de 12 a 18 horas. A fecundação propriamente dita se dá quando ocorre a penetração do espermatozoide no oócito, este por sua vez retoma a meiose e completa a extrusão do segundo corpúsculo polar, a formação dos pronúcleos masculino e feminino, e a singamia restabelecendo-se o número de cromossomos (Gordon, 2003).

O cultivo *in vitro* ocorre após a singamia. Formam-se os zigotos que multiplicam suas células por sucessivas divisões mitóticas. A partir desse momento ocorre a transição materno-zigótica quando há a ativação do genoma embrionário (com 8 a 16 células), compactação (mórula com 32-64 células), diferenciação do trofoblasto e embrioblasto, e a blastulação com a formação do blastocisto (Gonçalves et al., 2008). Segundo Lonergan (2006) a qualidade dos embriões produzidos está diretamente relacionada ao cultivo embrionário.

Diferenças entre embriões produzidos *in vitro* e embriões *in vivo* vem sendo estudadas com o objetivo de elucidar processos que possam aumentar o êxito na produção *in vitro* de embriões, dentre elas, anormalidades mitocondriais (Crosier et al., 2001) como cristas periféricas e formato circular (Fair et al., 1997), redução na quantidade de microvilosidades que recobrem a membrana plasmática e das junções GAP, diminuindo o contato entre as células do trofoblasto (Bonil et al., 1999), diferenças metabólicas (Thompson, 2000), a reduzida expressão de comunicações intercelulares, a compactação menos pronunciada, ao disco embrionário geralmente menor, com menor quantidade de células totais, zona pelúcida mais frágil e acúmulo de espécies reativas a oxigênio (Dode et al., 2013).

Embriões produzidos *in vitro* possuem grande acúmulo intracelular de lipídeos e decréscimo na densidade de mitocôndrias maduras quando comparados com embriões *in vivo* (Dode et al., 2013). Sua influência negativa à criopreservação de embriões bovinos pode estar associada a mitocôndrias anormais ou imaturas, microvilosidades mais curtas e menos numerosas, complexos juncionais pouco desenvolvidos, interrupção de genes responsivos ao estresse prejudicando a qualidade do embrião (Rizos et al., 2003). Todas essas diferenças nas características físicas e morfológicas dos embriões produzidos *in vitro* podem estar diretamente relacionadas ao fato destes serem menos resistentes à criopreservação do que aqueles produzidos *in vivo* (Dode et al., 2013).

Considerando que a criotolerância reduzida de embriões produzidos *in vitro*, especialmente aqueles cultivados em meio suplementado com SFB, também parece estar diretamente correlacionada ao acúmulo excessivo de lipídios durante o desenvolvimento embrionário *in vitro* e sua influência prejudicial na qualidade dos embriões, criopreservação e conseqüentemente baixa sobrevivência após o descongelamento (Rizos et al., 2003). Desde modo, a cultura de embriões bovinos em sistemas livres de soro, reduzindo o acúmulo de gotículas de lipídios citoplasmáticos em blastocistos ou a remoção mecânica de lipídios intracelulares excessivos de embriões iniciais, melhora significativamente sua resistência à criopreservação (Abe et al., 2002a). Contudo, a reserva lipídica presente nos oócitos e embriões é de suma importância na sobrevivência e viabilidade dos mesmos, principalmente como reserva energética (Sturmey et al., 2009).

Sugere-se que em decorrência da criopreservação haja acentuada peroxidação dos lipídios poli-insaturados contidos nestes embriões, aumentando a produção de radicais livres. Dessa forma, o excesso de lipídios nos embriões aumentaria ainda mais esta produção de radicais livres e acentuaria o processo de morte embrionária (Barceló-Fimbres; Seidel Jr, 2007b).

Em humanos, a gravidez clínica, implantação e as taxas de gravidez em curso foram maiores com meio de transferência de ácido hialurônico (HA) comparado com meio de transferência de albumina (Mahani, 1998). A suplementação de meios de cultura semi-definidos e definidos com 1 mg/mL de HA melhora o desenvolvimento de embriões bovinos nas etapas de MIV e FIV até o estágio de blastocisto, sem afetar a qualidade do embrião e a sobrevivência pós-congelamento (Furnus et al., 1998).

Em cultivo de embriões de suínos, a suplementação de 1 mg/mL de ácido hialurônico aumentou as porcentagens obtidas de embriões clivados para ~ 95 %, mórulas para ~ 87 %; blastocistos para ~ 77 % e o potencial da membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi_m$) e a concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) foram ~ 1,6 e 2,7 vezes menores, respectivamente, do que os blastocistos do tratamento controle (Romek et al., 2017).

Foi observado que embriões humanos e bovinos possuem em sua superfície receptores para ácido hialurônico até a fase de blastocisto. Pesquisa em embriões de bovinos sugere que o uso de ácido hialurônico em meio de cultivo *in vitro* pode aumentar a taxa de blastocisto (Mahani, 1998).

Em conclusão, a adição de ácido hialurônico ao cultivo de embriões aumentou o rendimento de blastocisto, melhorou a sobrevivência após a vitrificação e aumentou a sobrevivência pós-transferência de mórula fresca e embriões em estágio de blastocisto (Romek, 2017).

A suplementação do meio de maturação *in vitro* com antioxidantes melhora a qualidade dos embriões, quando comparados o número total de células, mas não nas taxas de eclosão. Também não foi possível afirmar melhora na quantidade de produção de embriões no que diz respeito às taxas de clivagem e blastocisto, o que talvez, sugere a necessidade de estudos mais detalhados. Os antioxidantes quercetina ($r=0,86$), vitamina C ($r=0,86$) e resveratrol ($r=0,91$) foram capazes de diminuir as concentrações de espécie reativa de oxigênio (ROS) em relação aos grupos cisteamina ($r=0,98$), carnitina ($r=0,98$) e controle ($r=1,00$) (Sovernigo, 2015).

Vitamina C (ácido ascórbico) é uma vitamina hidrossolúvel, considerada o mais importante antioxidante do fluido extracelular (Alvarez et al., 2006; Hossein et al., 2007). Sua ação abrange a redução de espécie reativa de oxigênio até a prevenção de formação de hidroperóxido de lipídeos nas lipoproteínas plasmáticas, levando a proteção celular dos danos oxidativos (Annae e Creppy, 2001; Nordberg e Árner, 2001). O ácido ascórbico tem como uma das principais funções a secreção hormonal, síntese de colágeno e antioxidação (Sovernigo, 2015).

Considerando a diversidade de agentes crioprotetores e as variações de metodologias de cada técnica e de resultados pós-descongelamento de cada técnica, os métodos de congelamento atuais diferem quanto ao tipo e concentração de crioprotetores, números de etapas para equilíbrio do embrião ao meio, técnica de criopreservação, tempo de exposição e números de etapas para descongelamento (Vajta et al., 1998). No entanto, até o momento não foi proposto um protocolo ideal para a criopreservação de embriões. Dentre os agentes crioprotetores testados, os mais utilizados são o glicerol, etilenoglicol e o dimetilsulfóxido (DMSO) (Lemos, 2010).

O êxito do método de vitrificação depende também do estágio de desenvolvimento e a fonte dos embriões (*in vivo* ou *in vitro*). Dessa forma, Vajta et al. (1998) demonstraram que a viabilidade de embriões bovinos vitrificados no estágio de blastocisto expandido é maior do que no estágio de mórula, devido a sua maior tolerância ao resfriamento depois da formação do blastocele (Lemos, 2010).

Análises ultraestruturais por meio de microscopia eletrônica de transmissão demonstraram que os embriões vitrificados apresentam maior preservação das células. Os embriões vitrificados com DMSO tiveram maiores taxas de sobrevivência *in vitro* (47,36 %) comparado ao uso de dimetilformamida (31,58 %). Os congelados pelo método clássico obtiveram 25 % (Lemos, 2010).

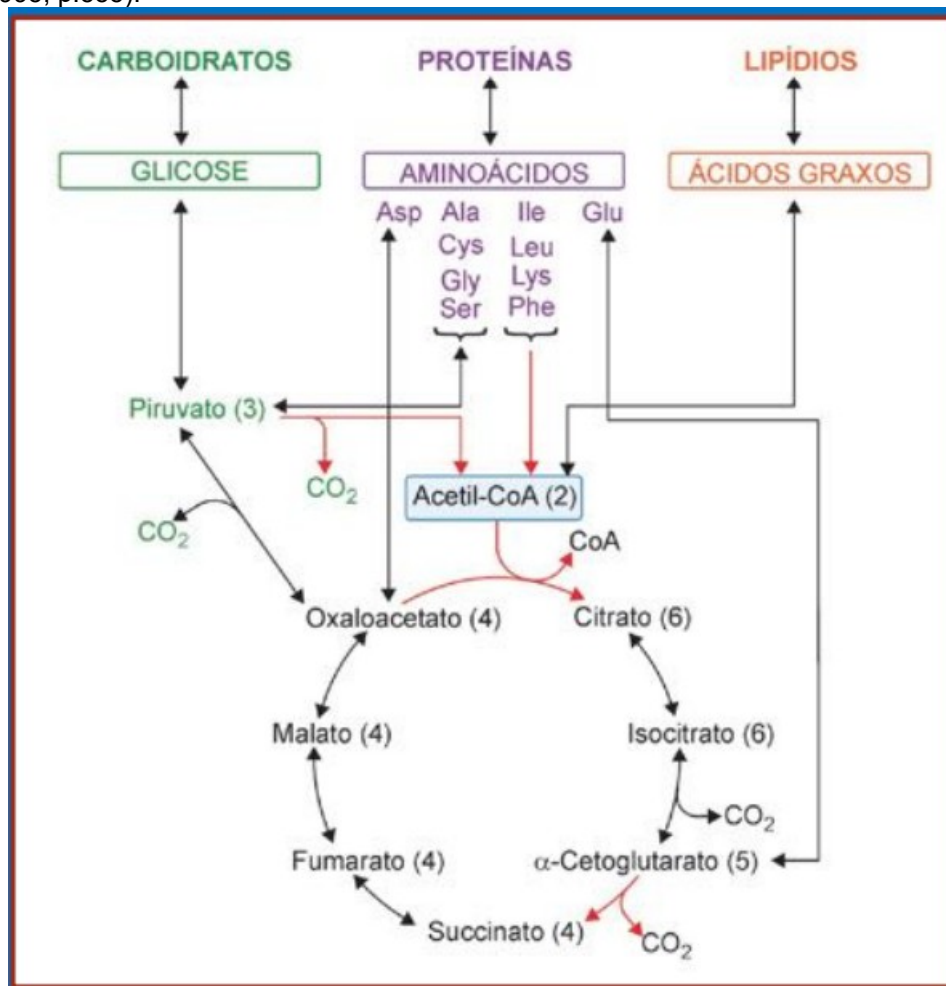
No processo de vitrificação, as altas concentrações de crioprotetores fazem com que a célula passe para um estado vítreo antes que os cristais de gelo sejam formados no seu interior, diminuindo a formação dos mesmos. Todavia, a adoção de altas concentrações das substâncias crioprotetoras, pode provocar lesões de toxicidade na célula (Saragusty e Arav, 2011). A criopreservação pelo método de congelamento lento utiliza baixas concentrações de crioprotetores, tendo menor toxicidade que o método de vitrificação e, por isso, provocando menos lesões celulares. Entretanto, essa condição não é eficiente para impedir a formação de cristais de gelo (Arav et al., 2002). Dessa forma, a técnica de criopreservação escolhida (congelamento lento ou vitrificação) influencia no aparecimento das injúrias provocadas em cada procedimento (Carrilho, 2013).

2.2. Metabolismo energético de embriões

O metabolismo energético durante o desenvolvimento inicial embrionário é relativamente baixo e se intensifica a partir da ativação do genoma embrionário aumentando gradativamente (Thompson et al., 1996). Atinge seu ápice durante a blastulação, em função da intensificação na síntese proteica e da atividade dos sistemas de transportes de íons (bomba Na^+/K^+) envolvidos nesta etapa do desenvolvimento embrionário, sendo necessário maior produção de adenosina trifosfato (ATP) (Thompson et al., 1998, 2000).

O principal substrato para produção de energia nas células é a acetilcoenzima A (acetil-coA), que pode ser produzida a partir do metabolismo dos carboidratos, aminoácidos e dos ácidos graxos (Figura 1).

Figura 1: Esquema representativo do metabolismo de carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos (Adaptado de Garret, R. H., Grisham, C. M., Biochemistry, Sunday Colege Publishing, USA, 1995, p.555).



2.2.1. Metabolismo da glicose

A glicose é um dos substratos mais utilizados na produção de energia durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário pós-compactação (Suttonmcdowall et al., 2012), ao ser oxidada via glicólise ou via pentose-fosfato (Khurana; Niemann, 2000). A via de metabolização dependerá das relações ATP/ADP e NADPH/NADP existentes no citosol celular. Quando a relação ATP/ADP é baixa e a relação NADPH/NADP é alta, a glicose vai ser degradada pela via glicolítica, produzindo ATP. A via das pentoses é inibida e não há síntese de ácidos graxos. Porém, se a relação ATP/ADP é alta, a via glicolítica é inibida. A glicose é oxidada pela via das pentoses, favorecendo a síntese de ácidos graxos.

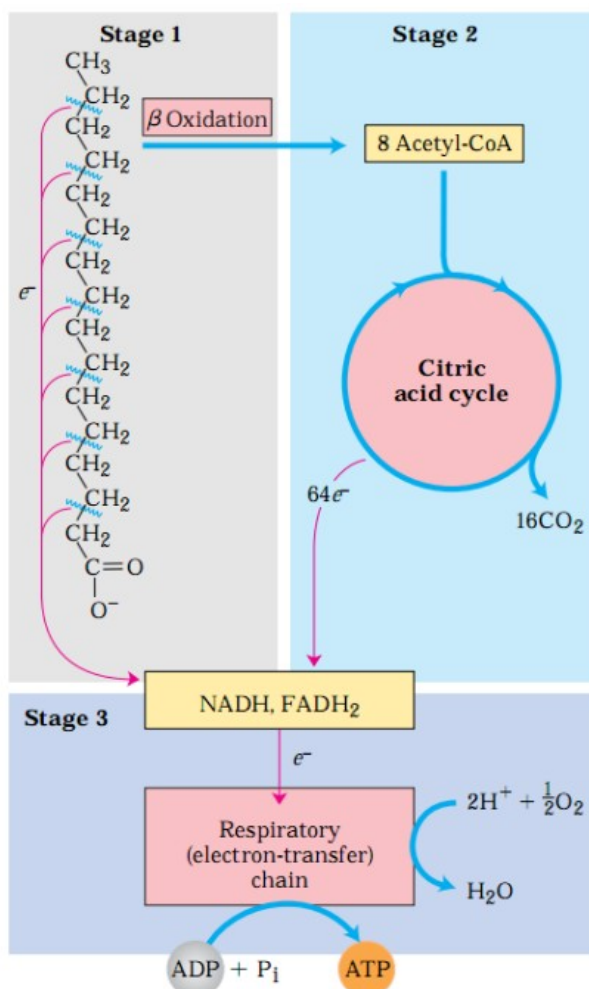
A oxidação da glicose via pentose-fosfato ocorre no citosol celular e tem como principais produtos a ribose-5-fosfato e o NADPH (Barceló-Fimbres; Seidel Jr, 2007). A ribose-5-fosfato é a pentose constituinte dos nucleotídeos que compõe os ácidos nucleicos, e de muitas coenzimas, como o ATP, NADH, FADH₂ e coenzima (Khurana; Wales, 1989). Já o NADPH⁺, é necessário na redução das vias biossintéticas como aceptor de elétrons, participa na transformação do malato em piruvato, síntese de ácidos graxos, e reduzindo os efeitos deletérios de radicais livres (Wales; Du, 1993; Harvey et al., 2002). Na via da glicólise, cada molécula de glicose é oxidada produzindo duas moléculas de piruvato, duas moléculas de ATP e duas moléculas de NADH⁺. Sob ação do complexo piruvato desidrogenase, os piruvatos formados são novamente oxidados, perdem um grupamento carboxil na forma de CO₂, e os outros dois carbonos remanescentes são convertidos a acetil, da acetil-coA. Desta maneira, a partir de cada piruvato, produz-se uma molécula de acetil-CoA (Marzzoco; Torres, 2007; Nelson; Cox, 2011). A acetil-coA formada entra em uma via de oxidação final comum, seja para a acetil-coA derivada glicólise e da oxidação do piruvato ou dos ácidos graxos, quando são oxidadas à CO₂ no ciclo de Krebs (FERNIE et al., 2004).

2.2.2. Metabolismo dos ácidos graxos

Os triacilglicerois (TAG) são os principais lipídios fornecedores de energia às células, cerca de 95 % desta energia provem dos três ácidos graxos que os compõe e somente 5 % são fornecidos pelo glicerol. No começo, a lipase atua liberando o grupamento glicerol, este é fosforilado pela glicerol-cinase e origina o glicerol-3-fosfato que é oxidado a diidroxiacetona-fosfato. Então, a triose-fosfato-isomerase age convertendo-a em gliceraldeído-3-fosfato que é oxidado na glicólise. Já os ácidos graxos serão oxidados nas mitocôndrias (Nelson; Cox, 2011; Dunning et al., 2012). Para que os ácidos graxos sejam oxidados, é necessário que sejam convertidos em uma forma ativada (acil graxo-coA). As enzimas acil-coA-sintases catalisam a formação da ligação tio-éster entre o carboxil do ácido graxo e o tiol (-SH) da coenzima, produzindo uma acil graxo-coA, AMP e pirofosfato (Marzzoco; Torres, 2007). A oxidação mitocondrial dos ácidos graxos ocorre em três etapas (Figura 2), a primeira, a beta-oxidação, quando os ácidos graxos sofrem ciclos de

remoção oxidativa da sua cadeia carbonada, cada ciclo é formado por uma sequência de quatro reações que no final gera uma molécula de acetil-coA. Portanto a cada ciclo é gerada uma molécula de acetil-coA. A quantidade de acetil-coA gerado vai depender do tamanho da cadeia de carbonos, que determina a quantidade de ciclos. Em cada ciclo são retirados dois carbonos da cadeia carbonada do ácido graxo para a formação do acetil-coA, sendo que no último ciclo são geradas 2 moléculas de acetil-coA. Quando se trata de cadeias ímpares de ácidos graxos, o último ciclo irá gerar uma de acetil-coA (2 carbonos) e uma molécula de 3 carbonos chamada de propionil-coA, que será oxidada em succinil-coA a qual é utilizada no ciclo de Krebs e cadeia respiratória (Shulz,1991; Marzzoco; Torres, 2007; Nelson; Cox, 2011).

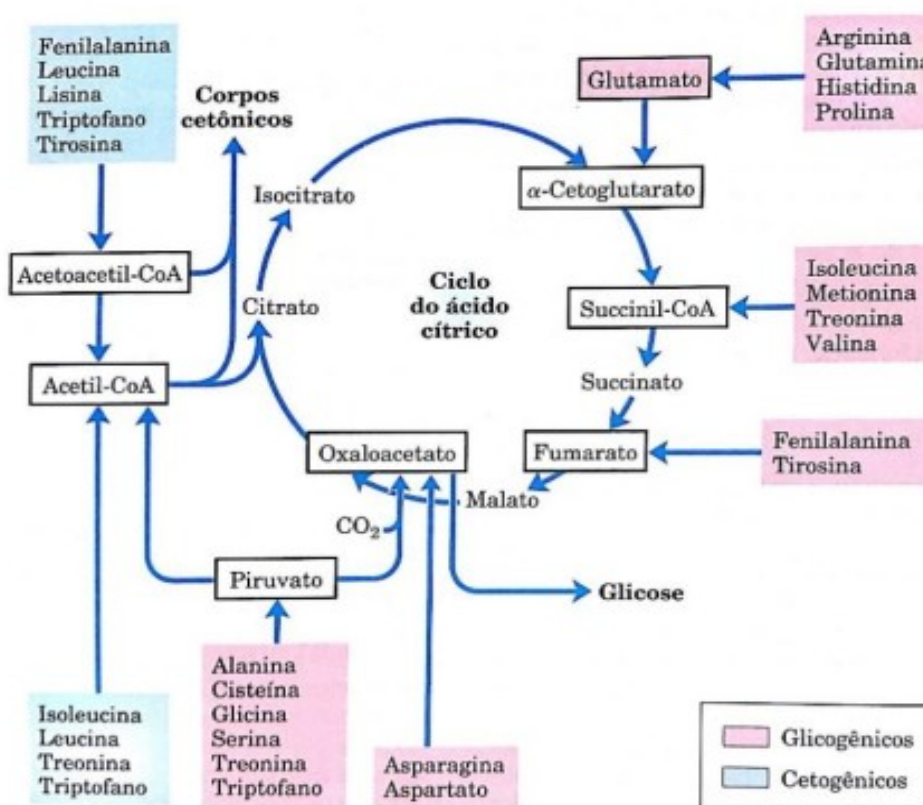
Figura 2: Etapas da oxidação dos ácidos graxos.



2.2.3. Metabolismo dos Aminoácidos

As vias do metabolismo dos aminoácidos, normalmente são menos ativas do que a glicólise e a oxidação dos ácidos graxos. O fluxo ao longo das vias catabólicas varia muito, dependendo do balanço entre as necessidades para processos biossintéticos e disponibilidade dos aminoácidos (Figura 3) (Mifflin; Lea, 1977; Wu, 2009; Nelson; Cox, 2011). Todas as vias catabólicas convergem para a formação de conjuntos de aminoácidos que formarão precursores ou componentes do ciclo de Krebs.

Figura 3: Produtos do metabolismo dos aminoácidos (Nelson; Cox, 2011).



2.2.4. Ciclo de Krebs e cadeia respiratória

O ciclo de Krebs ou ciclo do ácido cítrico ocorre nas mitocôndrias. Compreende uma série de reações, sendo a primeira a condensação de acetil-coA

2.3. A importância dos lipídios na maturação de oócitos e no desenvolvimento embrionário.

Os triglicerídeos ou triacilgliceróis são os lipídeos mais abundantes no citoplasma das células dos mamíferos e estão armazenados na forma de gotículas (Aardema et al., 2011). Esses lipídios têm como principal função o armazenamento de energia para oócitos e embriões (Sturmey et al., 2009) e devem suprir as necessidades energéticas requeridas durante os processos de maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial, por meio da oxidação dos ácidos graxos para produção de ATP. O acúmulo de lipídeos pode acontecer em vários momentos durante a oogênese, desde a progressão do folículo primordial até o estágio de metáfase II quando ocorrem muitas modificações, alterações nucleares e citoplasmáticas, porém não se sabe exatamente quando esta deposição ocorre (Sturmey et al., 2009). Já os fosfolipídios participam na formação das membranas celulares eucarióticas, tendo papel importantíssimo na fluidez e permeabilidade das mesmas, porém a sua influência na criopreservação ainda é pouco estudada (Van Meer et al., 2008).

Durante a maturação oocitária ocorre redução na quantidade de triacilgliceróis, simultânea com a migração mitocondrial da periferia para a região cortical destes oócitos, o que leva a crer que a partir do momento em que os oócitos perdem a ligação com as células foliculares passam a utilizar uma fonte de energia intracelular para produção de ATP necessário durante a síntese proteica, retomada da meiose e maturação citoplasmática (Ferguson; Leese, 1999; Kim et al., 2001). Após a maturação, a quantidade de lipídios se mantém estável durante a fertilização até a fase embrionária de oito células. Os triacilgliceróis são os lipídios mais sintetizados e estocados podendo chegar a 88 % do total de lipídeos nos embriões cultivados *in vitro*, dispersos na massa celular interna e nos trofoblastos, enquanto representam aproximadamente 40 a 50 % do total de lipídios nos embriões bovinos produzidos *in vivo*, e a maioria das gotículas encontram-se na massa celular interna (Fergusson; Leese, 1999; Sudano et al., 2012).

A medição do consumo de oxigênio pode ser indicativo da capacidade dos embriões produzirem ATP (Stojkovic et al., 2001), bem como as fontes proteicas utilizadas nos meios de produção *in vitro* de embriões, contudo os mecanismos do

acúmulo lipídico no citoplasma destes embriões ainda não estão bem esclarecidos (Gomez et al., 2008; Sudano et al., 2011).

Existem inúmeras hipóteses para o aumento destes teores de lipídios. Uma delas é que em meios de cultivo com presença de Soro Fetal Bovino, as lipoproteínas do soro são absorvidas pelas células embrionárias, levando em conta que os embriões produzidos *in vitro* podem facilmente incorporar ácidos graxos presentes nos meios de cultivo de desenvolvimento (Diez et al., 2001; Abe et al., 2004).

Outra hipótese é de que nos embriões produzidos *in vitro* em meios suplementados com SFB cerca de 70 % das mitocôndrias apresentam características de imaturidade como cristas periféricas e formato circular, contra aproximadamente 10 % em embriões cultivados em meios livres de SFB (Fair et al., 1997; Abe et al., 2002). Com apenas 30 % da capacidade mitocondrial em funcionamento, ocorre um desequilíbrio na β -oxidação dos ácidos graxos e conseqüentemente, aumento no acúmulo lipídico (Crosier et al., 2001). Sudano et al. (2011) relataram correlação entre diferentes concentrações de SFB (10, 5 e 2,5 %) utilizadas nos meios de cultivo embrionário com a taxa de produção de embriões e quantidade de lipídios acumulados, índice de apoptose e criosobrevivência de blastocistos bovinos. Foi observado que quanto mais elevada a concentração de SFB, melhores foram as taxas de produção de blastocistos, maior acúmulo lipídico, níveis de apoptose mais elevados e piores índices de sobrevivência à criopreservação. Exceto o grupo cultivado com 2,5 % de SFB que apresentou taxas de apoptose semelhantes ao grupo cultivado sem SFB.

2.4 Uso de antioxidantes na produção de embriões

Antioxidante pode ser definido como qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada aos substratos oxidáveis, significativamente atrasa ou inibe aquele substrato (Halliwell; Gutteridge, 1989).

Os antioxidantes tem a capacidade de transformar espécie reativa de oxigênio em água (Halliwell e Gutteridge, 1999). Naturalmente, na tuba uterina, o fluido folicular é rico em antioxidantes, diferente dos meios de produção *in vitro* de embriões que além de dispor de poucas quantidades de antioxidantes, tem elevadas concentrações de espécie reativa de oxigênio, fazendo-se necessário então a adição

de antioxidantes nos meios de cultura (Silva et al., 2010). Existem dois sistemas de defesa antioxidantes: os antioxidantes enzimáticos e os não enzimáticos.

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

A proteção antioxidante é realizada por moléculas que protegem os alvos biológicos contra o processo oxidativo, atuando para inibir a formação de radicais livres (quelar íons metais ou suprimir enzimas geradoras de radicais livres), eliminar ou inativar radicais livres, formando um produto estável, ou participar do processo de reparo (Ribeiro, 2005). Esse grupo é composto por várias substâncias, tais como ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), selênio, zinco, taurinas, hipotaurinas, glutathione, betacaroteno, caroteno, cistina, flavonoides, L-cisteína, clorofilina entre outras tantas (Bianchi e Antunes, 1999).

Visando reduzir os efeitos do estresse oxidativo e considerando que o acúmulo de lipídeos pode ser resultado da captação desses do meio ou devido ao metabolismo ineficiente das mitocôndrias embrionárias (Dode et al., 2013), diversos antioxidantes veem sendo adicionados aos meios de produção *in vitro* de embriões, exercendo influência positiva sobre o desenvolvimento embrionário de bovinos, aumentando o número de células (Sovernigo, 2015).

2.4.1 – Ácido Ascórbico ou Vitamina C

O ácido ascórbico ou vitamina C é um importante antioxidante não enzimático e hidrofílico, capaz de neutralizar peróxidos de hidrogenio, ânions superóxido, radicais livres hidroxil e oxigênio individual (Halliwell; Gutteridge, 1989).

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

2001). Adicionalmente, é possível que sua presença em grandes quantidades no fluido folicular (Paszowski; Clarke, 1999), induza a liberação de taurina e hipotaurina no líquido tubárico no momento da ovulação (Guerin et al., 2001), indicando que este pode atuar fisiologicamente como um antioxidante no desenvolvimento de oócitos e embriões (Paszowski; Clarke, 1999). Tem como uma das principais funções a secreção hormonal, síntese de colágeno e antioxidação (Thomas et al., 2001; Monteiro et al., 2005).

2.4.2 – Ácido Hialurônico (AH)

O ácido hialurônico (AH) tem uma estrutura de GAG simples e consiste de um polímero alternado de N-acetilglicosamina e ácido glicurônico com, aproximadamente, 50.000 unidades dissacarídicas repetitivas e unidas por uma ligação glicosídica β -(1,3) (Lodish et al., 2000), além de ser o único não sulfatado (Kjellén & Lindahl, 1991). A molécula de AH pode emaranhar-se por meio de interações associativas específicas com grande número de outras moléculas para formar uma rede contribuindo para manutenção das propriedades da matriz onde se apresenta. Essas moléculas incluem, dentre várias, proteínas ligantes e outras moléculas de glicosaminoglicanos constituindo assim os proteoglicanos.

Estudos têm focado sua atenção na suplementação de meios de cultura de embriões *in vitro* com hialuronano (HA) devido a suas propriedades bioquímicas (Palasz et al., 1993). Funções biológicas importantes não são adequadamente reguladas durante o cultivo *in vitro* devido a natureza bidimensional da cultura. Ácido hialurônico forma uma rede tridimensional e gelatinosa que melhora a interação entre os receptores celulares e as moléculas no ambiente externo, melhorando a ligação de moléculas com fatores de crescimento polipeptídicos que desempenham papel importante durante o desenvolvimento embrionário inicial (Tian et al., 2005). É um dos principais componentes do complexo cumulus-oócito (COCs) e é sintetizado e secretado pelas células da granulosa sob a estimulação de LH e FSH (Eppig, 1982).

A interação do HA com o receptor CD44 nas células granulosas durante a expansão cumulus-oócito reduz a concentração de Cx43. Como resultado, o transporte de cAMP entre as células e o oócito é bloqueado, a concentração de

cAMP nos oócitos diminui, ocorre a ativação do MPF, que é responsável pela retomada da meiose (GVBD) (Yokoo et al., 2010).

Muitos processos celulares são regulados pela interação entre HA e os receptores de superfície das células do cumulus, como CD44, RHAMM (receptor para HA motilidade mediada) e ICAM-1 (adesão intercelular molécula 1) (Enwistle et al., 1996; Knudson et al., 1996). Esses processos incluem a manutenção da homeostase tecidual (Knudson e Knudson, 1993), adesão e migração celular (Thomas et al., 1992; Saegusa et al., 1998), proliferação e diferenciação celular, e a inibição de apoptose e resposta imune (Kaneko et al., 2000).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Produção *in vitro* de embriões

3.1.1. Coleta de oócitos

Ovários bovinos foram obtidos em frigorífico FRIPAI localizado no município de Juiz de Fora - MG (SIF/DISPOA 000213498) e transportados para o laboratório (aproximadamente 1 hora após os abates) em solução salina NaCl 0,9 % estéril a 37 °C em recipiente térmico. Os complexos cumulus-oócito (COCs) foram aspirados dos folículos antrais (2–8 mm de diâmetro) usando agulha 30x8 e seringa de 10 mL.

Durante as aspirações dos folículos, o fluido folicular foi acondicionado em tubos de 50 mL em banho-maria a 36 °C. Os oócitos com citoplasma uniformemente granuloso e mais de três camadas de células cúmulus compactas foram selecionados e submetidos à maturação *in vitro*.

3.1.2 Preparo das alíquotas de estoque - AEVitC e de alíquotas de trabalho - ATVitC de Vitamina C, para maturação e para cultivo “in vitro” e de alíquotas de trabalho de Ácido Hialurônico – ATMHA, para maturação “in vitro”.

3.1.2.1. Alíquotas de solução de Estoque de Vitamina C – AEVitC

Ao frasco de 100 mg L-Ascorbic Acid (código A4403 – Sigma) foram adicionados 10 mL de água (Sigma, código W3500). Após total dissolução da Vitamina C, a mesma foi acondicionada em 25 eppendorfs, fração de 500 µL/eppendorf, formando a AEVitC, na concentração de 10 mg/mL, que foram armazenadas a -20 °C.

3.1.2.2. Alíquotas de solução de trabalho de Vitamina C – ATMVitC

Uma alicota AEMVitC, contendo 500 μL foi fracionada em 25 alíquotas de 20 μL (solução de trabalho - ATMVitC) e acondicionadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.1.2.3. Preparo da solução de trabalho de Ácido Hialurônico (H5388) - ATMHA

Em um eppendorf foi adicionado 0,0006 gramas de Hyaluronic acid sodium salt from rooster comb (código H5388, Sigma) e 1194 μL de meio de maturação – MML, previamente preparado, contendo TCM-199 (Gibco) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (Crypion), 0,2 mM de piruvato (Sigma), 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hormônio folículo estimulante – FSH (Foltropin, Bionicle), hormônio luteinizante – LH (Folligon, Intervet), 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estradiol (Sigma) e 66,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ amicacina (Teuto). Para dissolução do mesmo foram necessárias sucessivas agitações em vortex, intercaladas em períodos de aproximadamente 5 minutos de descanso em incubadora.

3.1.2.4. Preparo dos tratamentos para maturação *in vitro*

Controle 1: 597 μL de Meio de maturação – MML acrescido de 3 μL de água (W3500);

Tratamento 2: 597 μL de solução de trabalho de Ácido Hialurônico - ATMHA + 3 μL de água (W3500)

Tratamento 3: 597 μL de Meio de Maturação - MML acrescido de 3 μL de solução de trabalho de vitamina C - ATVitC

Tratamento 4: 597 μL de solução de trabalho de Ácido Hialurônico - ATMHA + 3 μL de solução de trabalho de Vitamina C - ATVitC

Tratamento 5 – meio de maturação comercial – MMC, controle 2

3.1.2.5. Preparo das placas para maturação *in vitro*

Foram montadas as placas com gotas de 100 μL , sendo 5 gotas por placa, cada gota correspondendo a um tratamento, na seguinte sequência: Gota 1 – Controle 1; Gota 2 – Tratamento 2; Gota 3 – Tratamento 3; Gota 4 – Tratamento 4 e

Gota 5 – Tratamento 5, cobertas com 4 mL de óleo mineral e estabilizadas em incubadora por 2 horas.

3.1.3. *Maturação “in vitro”*

Foi realizada em incubadora umidificada de 5 % de CO₂ em ar, a 38,5 °C, por aproximadamente 24 horas.

Após a maturação, 100 % dos oócitos foram fertilizados.

3.1.4. *Fertilização “in vitro”*

3.1.4.1. Preparo dos meios para fertilização *in vitro* – MFIV

O meio de fecundação - MFIV, composto por meio Fert-Talp suplementado com 0,6 % de albumina sérica bovina livre de ácidos graxos – BSA (Sigma), 0,2 mM piruvato (Sigma), 10 µg/mL de heparina (Sigma), 10 µM hipotaurina (Sigma), 1,8 µM de epinefrina e de 18 µM penicilamina e 66,7 µg/mL de amicacina (Teuto).

3.1.4.2. Montagem das placas para fertilização *in vitro*

Foram montadas as placas com 5 gotas de 30 µL contendo MFIV, cobertas com 4 mL de óleo mineral e estabilizadas em incubadora por 2 horas.

3.1.4.3. Preparo do Percoll

Em um tubo tipo eppendorf, foram adicionados 400 µL de Percoll 90 % e sobre este 400 µL de Percoll 45 % formando um gradiente, e levado a incubadora por tempo mínimo de 30 minutos antes da FIV.

3.1.4.4. Descongelamento do sêmen e seleção espermática

A metodologia usada para separação dos espermatozoides foi feita pelo método de gradiente de Percoll (Parrish et al., 1988). O sêmen foi descongelado em banho-maria em uma temperatura de 37 °C por um período de 30 segundos e depositado sobre a coluna superior do gradiente de Percoll (gradiente 45 % superior e 90 % inferior), e submetido a uma força centrífuga de 600 x g por 5 minutos. Após

a centrifugação foi desprezado o sobrenadante com auxílio de uma pipeta. O pellet contendo os espermatozoides foram ressuspensos em 1 mL de MFIV e submetido a uma força centrífuga de 150 x g por 3 minutos para remoção do excedente de Percoll. O pellet foi ressuspensado em MFIV para ser usado na inseminação dos oócitos com concentração final de 2×10^6 espermatozoides/mL e adicionado às micro gotas de meio de fecundação.

Em seguida os COCs foram transferidos para as microgotas de MFIV, cada gota correspondendo a um tratamento, na seguinte sequência: Gota 1 – Controle 1; Gota 2 – Tratamento 2; Gota 3 – Tratamento 3; Gota 4 – Tratamento 4 e Gota 5 – Tratamento 5.

A fertilização foi realizada em incubadora umidificada de 5 % de CO₂ em ar, a 38,5 °C, por aproximadamente 18 horas.

Após a fertilização, 100 % dos zigotos foram cultivados.

3.1.5. Cultivo de embriões *in vitro*

3.1.5.1. Preparo das alíquotas de trabalho de Ácido Hialurônico (H5388, Sigma) – ATCHA, para cultivo *in vitro*.

Em um eppendorf foi adicionado 0,0006 gramas de Hyaluronic acid sodium salt from rooster comb (código H5388, Sigma) e 1194 µL de meio de cultivo - MCL, previamente preparado, composto de Fluido Sintético do Oviduto mSOF (Holm et al., 1999), 3 % de Soro fetal bovino (Cripion), 4 mg/mL de albumina sérica bovina (Sigma), 0,75 mg/mL de glicina (Sigma), 0,15 mg/mL de alanina (Sigma) e 66,7 mg/mL de amicacina (Teuto). Para dissolução do mesmo foram necessárias sucessivas agitações em vortex, intercaladas em períodos de aproximadamente 5 minutos de descanso em incubadora.

3.1.5.2. Preparo dos tratamentos para cultivo *in vitro*

Controle 1: 597 µL de MCL acrescido de 3 µL de água (W3500, Sigma)

Tratamento 2: 597 µL de ATCHA + 3 µL de água (W3500, Sigma)

Tratamento 3: 597 µL de MCL acrescido de 3 µL de ATVitC

Tratamento 4: 597 µL ATCHA + 3 µL de ATVitC

Tratamento 5: meio de cultivo comercial – MCC – controle 2

Em seguida foram montadas as placas com gotas de meio de maturação cobertas com óleo mineral e estabilizadas em incubadora por 2 horas.

3.1.5.3. Montagem das placas de cultivo *in vitro*

Foram montadas as placas com gotas de 100 µL, sendo 5 gotas por placa, cada gota correspondendo a um tratamento, na seguinte sequência: Gota 1 – Controle 1; Gota 2 – Tratamento 2; Gota 3 – Tratamento 3; Gota 4 – Tratamento 4 e Gota 5 – Tratamento 5, cobertas com 4 mL de óleo mineral e estabilizadas em incubadora por 2 horas.

3.1.6 Cultivo “*in vitro*”

Após a fertilização os zigotos foram desnudados parcialmente com o auxílio de uma pipeta, lavados em duas gotas contendo 50 µL de meio de cultivo e transferidos para placas contendo microgotas de meio de cultivo em óleo mineral. Foram cultivados por 7 dias, a 38,5 °C em incubadora umidificada com 5 % de CO₂. Foram preservados os 5 grupos formados na maturação: controle 1 (MCL), tratamento 2 (597 µL de ATCHA + 3 µL de água (W3500, Sigma)), tratamento 3 (597 µL de MCL acrescido de 3 µL de ATVitC) tratamento 4 – (597 µL ATCHA + 3 µL de ATVitC) e tratamento 5 (meio de cultivo comercial - MCC - controle 2). Nesta etapa da produção *in vitro* - PIV foram feitas duas trocas parciais de 50 % do meio.

3.2. Congelamento de embriões

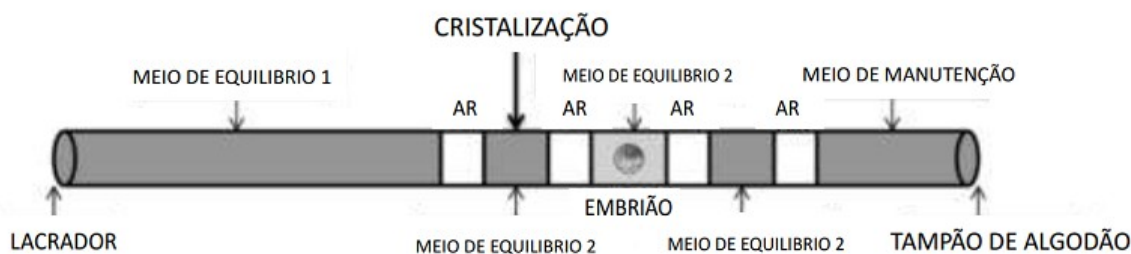
Os embriões produzidos foram classificados de acordo com a classificação da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS, 1998) e criopreservados. Do total de 454 embriões produzidos, 166 embriões, cerca de 36 % foram destinados ao método de congelamento lento e 288 embriões, cerca de 64 % para o método de vitrificação.

3.2.1. Método de Congelamento lento de embriões

No sétimo dia de cultivo de desenvolvimento os embriões produzidos (blastocistos iniciais, blastocistos e blastocistos expandidos) foram retirados das

gotas de cultivo e lavados em duas gotas em meio de manutenção - MME (composto por HTCM-199 (Gibco) suplementado com 6 % de soro fetal bovino (Crypion), 4 g/L albumina sérica bovina – BSA (Sigma), 0,2 mM de piruvato (Sigma) e 66,7 µg/mL amicacina (Teuto). Em seguida colocados em uma gota de 75 µL de meio de congelamento 1- MCE1 (HTCM-199 (Gibco) suplementado com 20 % SFB (TCM 199), 0,2 mM de piruvato (Sigma) e 66,7 µg/mL amicacina (Teuto) e adicionado de solução de Etileno Glicol - EG a 0,75 M) por 1 minuto, lavados em 1 gota de meio de congelamento 2 – MCE2 (HTCM-199 (Gibco) suplementado com 20 % SFB (Crypion), 0,2 mM de piruvato (Sigma) e 66,7 µg/mL amicacina (Teuto), de EG a 1,5 M e de sacarose 0,5 % e transferidos para outra gota contendo o mesmo meio. Inicia-se o envase dos embriões em palhetas 0,25 mm, logo após transferir o último embrião para a segunda gota de ME2, visando não ultrapassar o tempo máximo de 10 minutos. A sequência das colunas: MME , ar, uma pequena coluna de MCE2, ar, 1 coluna de MCE2 + embrião, ar, 1 pequena coluna de MCE2, ar, finaliza com 1 coluna de MCE1 (figura 5). A palheta é identificada e lacrada e colocada no congelador celular previamente estabilizado a -6 °C, quando inicia a curva de congelamento. Após dois minutos é feita a indução manual da cristalização (seeding). Após o seeding, os embriões foram mantidos -6 °C até completar 10 minutos, em seguida continuou a curva de congelamento a -0,5 °C/min até -32 °C. Os embriões foram mantidos por 5 minutos no congelador após atingir até -32 °C e em seguida as palhetas foram mergulhadas diretamente em N2 líquido, permanecendo armazenadas por pelo menos sete dias.

Figura 5: Representação esquemática da distribuição na palheta de soluções crioprotetoras e embrião para congelamento e transferência direta.



3.2.2. Vitrificação de embriões

No sétimo dia de cultivo de desenvolvimento os embriões produzidos (blastocistos iniciais, blastocistos e blastocistos expandidos) foram retirados das gotas de cultivo e lavados em duas gotas em meio de manutenção MME previamente estabilizado na incubadora. Em seguida, os embriões foram lavados em uma gota de aproximadamente 50 μ L e transferidos para uma gota de 100 μ L de meio de vitrificação 1- MVE1 (MME suplementado com 8,25 % de EG e 8,25 % de DMSO em temperatura ambiente por 8 minutos. Foram transferidos para a solução de vitrificação 2 – MVE2 (MME suplementado com 16,5 % de EG, 16,5 % de DMSO e 0,5 M de sacarose), em temperatura ambiente, e após 40 segundos foram pipetados, totalizando o volume máximo de 1 μ L (embriões e meio de vitrificação), para a extremidade da haste de vitrificação (figura 6). Ao completar 40 segundos de exposição, as hastes são imersas em nitrogênio líquido. Os embriões foram adequadamente armazenados em nitrogênio líquido até o momento do reaquecimento.

Figura 6: Representação esquemática da palheta de vitrificação



3.3. Aquecimento dos embriões vitrificados

3.3.1. Embriões por congelamento lento

Para o descongelamento os embriões foram retirados do botijão de estocagem e colocados em uma caixa de isopor contendo nitrogênio líquido.

Os embriões foram descongelados a partir do aquecimento das palhetas em temperatura ambiente durante 10 segundos e imersos em água a 32 °C por 1 minuto. Os embriões foram removidos da palheta e mantidos por 5 minutos na gota formada. Em seguida foram lavados em 2 gotas de meio de cultivo e transferidos para placa de cultivo.

Os embriões descongelados foram cultivados por 48 horas, em meio de cultivo contendo os respectivos tratamentos.

3.3.2. Embriões vitrificados

Para o reaquecimento, as hastes de vitrificação foram retiradas do botijão de estocagem e colocadas em uma caixa de isopor contendo nitrogênio líquido. A extremidade das hastes contendo os embriões foram imersas na primeira solução de aquecimento – SAE1 (MME suplementado com 20 % de SFB e 0,3 M de sacarose, a 37 °C) durante 3 minutos para iniciar o processo de remoção dos crioprotetores. Posteriormente, estes embriões foram transferidos para a segunda solução de aquecimento SAE2 (MME suplementado com 0,15 M de sacarose, a 37 °C) quando permaneceram por 3 minutos e para finalizar, são transferidos para gotas de MME por 3 minutos.

Os embriões aquecidos foram cultivados por 48 horas em meio de cultivo contendo os respectivos tratamentos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foi estudado três etapas da produção de embriões *in vitro* (maturação oócitaria, cultivo de embriões e criopreservação de embriões) porém utilizando diferentes meios de maturação oócitaria e cultivo de embriões, suplementados ou não com antioxidantes. Foram utilizados dois meios controles, o meio próprio do laboratório e um meio controle comercial. Para criopreservação, avaliou-se o efeito do uso de antioxidantes nas etapas de produção de embriões e a resistência dos embriões ao processo de criopreservação empregando os métodos de congelamento lento e a vitrificação.

No total de 1336 oócitos foram submetidos à etapa de maturação em seis rotinas laboratorial, totalizando 14 placas de cultivo celular. Total de 166 embriões foram submetidos ao método de congelamento lento e 288 embriões foram submetidos ao método de vitrificação.

4.1. Experimento 1: Avaliação do efeito da adição de vitamina C, de ácido hialurônico e de vitamina C + ácido hialurônico sobre a produção e qualidade de embriões produzidos *in vitro*.

Para a avaliação dos antioxidantes na produção *in vitro* de embriões, os oócitos foram submetidos a maturação, a fecundação e ao cultivo *in vitro*. Os resultados do desenvolvimento embrionário *in vitro* estão resumidos na Tabela 4.

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

Nas condições do presente estudo, foram testadas duas substâncias antioxidantes, a vitamina C e o ácido hialurônico individualmente ou em associação, visando diminuição dos radicais livres e consequente melhora na produção de embriões. Não houve diferença entre os valores médios obtidos nas taxas de conversão oócitos em embriões (33,98 %) obtidos nos diferentes tratamentos ($P > 0,05$; tabela 1).

Do total de 454 embriões obtidos, verifica-se que em sua maioria (89,87 % dos embriões se mostraram nos estados de desenvolvimento de blastocisto inicial (30,62 %), blastocisto (26,5 %) e blastocistos expandidos (32,60 %). Já nos estádios mais avançados se verificou apenas 7,25 % dos embriões estavam nos estádios de blastocistos em eclosão (5,73) ou eclodidos (1,54 %). Apenas 2,86 % dos embriões se encontravam no estágio de mórula compacta, ou seja, em estágio menos avançado em relação ao número total de embriões. Tais observações são consideradas satisfatórias, demonstrando sincronia no desenvolvimento embrionário nas condições artificiais *in vitro*, indicando ambientes semelhantes proporcionados pelos diferentes meios de maturação e cultivo nas diferentes etapas da PIVE (tabela 2).

De acordo com Van Soom et al. (2002), Furnus et al. (2008) e Silva, et al. (2011) é imprescindível o uso de antioxidantes na maturação citoplasmática, o que confere um posterior desenvolvimento até estágio de blastocisto. É importante haver equilíbrio entre a quantidade de espécie reativa de oxigênio, oriundos dos processos

oxidativos durante os eventos metabólicos intracelulares, que resultam na produção de radicais livres e as atividades antioxidantes, exercidas pelas substâncias intracelulares ou presentes na matriz extracelulares, no qual reduzem por meio das reações químicas, resultando na produção de moléculas não tóxicas as células. A presença das espécies reativas de oxigênio quando em concentrações adequadas, desempenham importantes funções fisiológicas reprodutivas, como na maturação oocitária, na esteroidogênese ovariana, na ovulação, na implantação, na formação de blastocisto, na manutenção do corpo lúteo, na gestação e na luteólise (Sabatini et al., 1999; Behrman et al., 2001).

TAB. 1: Taxa de conversão de oócitos em embriões bovinos produzido *in vitro*-PIVE, em meios de cultivo suplementados com diferentes agentes antioxidantes

TRATAMENTOS	TOTAL OÓCITOS	TOTAL EMBRIÕES	TxC %
CC	254	82	32,28
CL	264	94	35,61
VIT C	265	96	36,23
HA	272	92	33,82
HÁ_VIT C	281	90	32,03
TOTAL	1336	454	33,98

($P > 0,05$) pelo teste de qui-quadrado (4; 9,49); CC= meio de cultivo comercial; CL= meio de cultivo base sem complemento de agentes antioxidante; VIT C= meio de cultivo base suplementado com vitamina C; HA= meio de cultivo base suplementado com ácido hialurônico; HA_VIT C= meio de cultivo suplementado com vitamina C e ácido hialurônico; TxC= Taxa de conversão de oócitos em embriões;

TAB. 2: Frequências de estruturas embrionárias de bovino produzido *in vitro* -PIVE, em meios de cultivos suplementados com diferentes agentes antioxidantes

TRAT	BE	BN	BX	BL	BI	MOC	TOTAL
CL	1/(1,06)	5/(5,32)	30/(31,91)	23/(24,47)	32/(34,04)	3/(3,19)	94
HA	3/(3,26)	10/(10,87)	32/(34,78)	22/(23,91)	23/(25,00)	2/(2,7)	92
VIT C	3/(3,12)	6/(6,25)	28/(29,17)	28/(29,17)	30/(31,25)	1/(1,04)	86
HÁ_VIT C	0/(0,00)	2/(2,22)	39/(43,33)	26/(28,89)	18/(20,00)	5/(5,56)	90
CC	0	3/(3,66)	19/(23,17)	22/(26,83)	36/(43,90)	2/(2,44)	82
TOTAL	7/(1,54)	26/(5,73)	148/(32,60)	121/(26,65)	139/(30,62)	13/(2,86)	454/100,00

CL= meio de cultivo base sem complemento de agentes antioxidante; HÁ= meio de cultivo base suplementado com ácido hialurônico; VIT C= meio de cultivo base suplementado com vitamina C; HÁ_VIT C= meio de cultivo suplementado com vitamina C e ácido hialurônico; CC= meio de cultivo comercial; BE= Blastocisto eclodido; BN= Blastocisto eclodindo; BX= Blastocisto expandido; BL= Blastocisto; BI= Blastocisto inicial; MOC= Mórula compacta.

4.2. Experimento 2: Avaliar o efeito dos métodos de vitrificação e de congelamento lento sobre a viabilidade de embriões cultivados em meio de maturação e cultivo adicionado de antioxidantes nos diferentes grupos experimentais.

No presente experimento, a capacidade de sobrevivência à vitrificação dos embriões produzidos *in vitro*, apresentou diferença entre os valores médios dos diferentes tratamentos após 48 horas de incubação em estufa com 5 % de CO₂ a 38,5 °C, mas até 24 horas após o aquecimento, a taxa de sobrevivência embrionária não se mostrou diferente entre os valores obtidos nos diferentes tratamentos ($P > 0,05$). Os valores médios obtidos em cultivos com meios do próprio laboratório, meio comercial e o meio base suplementado com ácido hialurônico não diferiram entre si ($p > 0,05$), porém, o uso de meio base de maturação e cultivo *in vitro* suplementados com a Vitamina C ou vitamina C associado ao ácido hialurônico resultaram em taxas de sobrevivência com valores médios inferiores em relação aos demais meios estudados ($P < 0,05$; tabela 3).

Ao analisar os parâmetros morfológicos estruturais, em vários estudos foi verificado que a vitrificação pode afetar a morfologia nuclear (Luna et al., 2001), a formação de microtubulos (Chasombat et al.; 2015), a organização citoplasmática (Luna et al., 2001; Palmerini et al., 2014) e a integridade da membrana (Succu et al., 2007).

O HA fornece um meio extracelular expandido e altamente hidratado, propicio a migração celular e o seu aumento na matriz foi correlacionado com a migração celular na embriogênese. (Kudson e Kudson, 1996).

O ácido hialurônico é um componente da matriz celular e ocorre transitoriamente tanto no núcleo da célula como no citoplasma. Demonstrou promover motilidade, adesão e proliferação celular e, portanto, tem papel importante em processos como morfogênese, reparo de feridas, inflamação e metástase. Estes processos requerem movimento celular maciço e reorganização tecidual e são sempre acompanhados por concentrações elevadas de HA. Muitos dos efeitos do HA são mediados por receptores de superfície, três dos quais foram caracterizados molecularmente, o CD44, RHAMM e ICAM-1. Os sinais mediados por HA são transmitidos, pelo menos em parte pela ativação de cascatas de fosforilação de

proteínas, ligação de citocinas e estimulação de proteínas do ciclo celular (Entwistle et al., 1996).

A vitamina C trata-se de uma vitamina hidrossolúvel, considerada o mais importante antioxidante do fluido extracelular (Alvarez et al., 2006; Hossein et al., 2007). Sua ação abrange a diminuição de espécie reativa de oxigênio até a prevenção de formação de hidroperóxido de lipídeos nas lipoproteínas plasmáticas, levando a proteção celular dos danos oxidativos (Annae e Creppy, 2001; Nordberg e Árner, 2001). Adicionalmente, é possível que sua presença em grandes quantidades no fluido folicular (Paszkowski; Clarke, 1999), induza a liberação de taurina e hipotaurina no líquido tubárico no momento da ovulação (Guerin et al., 2001), indicando que este pode atuar fisiologicamente como um antioxidante no desenvolvimento de oócitos e embriões (Paszkowski; Clarke, 1999).

Inúmeros fatores podem justificar os melhores resultados nas taxas de sobrevivência de embriões após desvitrificação em relação ao congelamento lento: tempo excessivo de exposição à faixa térmica (entre 20 e 10 °C) correspondente à fase de solidificação dos lipídios (ZENON et al., 1999; GORDON, 2003) durante o congelamento, a remoção insuficiente da água intracelular antes de iniciar o processo de congelamento pode levar à formação de cristais de gelo, ou quando excessiva pode ser deletéria aos embriões (GONÇALVES et al., 2008).

Na vitrificação a alta velocidade de resfriamento e aquecimento proporcionam passagem muito rápida pela faixa de temperatura entre 20 e 10 °C. Por outro lado, a toxicidade química causada pelos crioprotetores e lesão osmótica pela desidratação inadequada também podem ocorrer ao longo do procedimento de criopreservação (KASAI et al., 2002).

Deste modo, há necessidade de buscar o equilíbrio entre a velocidade na curva de congelamento e o tempo de exposição aos crioprotetores, ocorrendo adequada desidratação prevenindo a formação de cristais de gelo e, ao mesmo tempo, minimizando o efeito tóxico pela demasiada exposição aos crioprotetores (CAMPOS-CHILLON et al., 2006).

Estudos utilizando protocolos de criopreservação semelhantes entre si e analisando a taxa de sobrevivência dos embriões, têm revelado diferenças entre as espécies de animais, tais como os estudos de Dinnyés et al. (2000) empregando o método de vitrificação em superfície sólida de oócitos bovinos, Begin et al. (2003) utilizando o mesmo método em caprinos e Diez et al. (2005) empregando o método

de vitrificação em bovinos. Provavelmente, uns dos fatores limitantes na produção *in vitro* se deva as diferenças percentuais na composição fosfolipídica da membrana nuclear e composição lipídica do citosol envolvidos nos processos metabólicos e oxidativos celular, com produção de radicais livres e nos seus mecanismos antioxidantes intrínsecos de cada espécie no intuito de manter o equilíbrio oxidativos/antioxidativos no citoplasma e membrana nuclear das células oócitárias e embrionárias, de forma que há diferença entre as espécies em sua capacidade de realizar o equilíbrio oxidativos durante os processos de maturação e cultivo *in vitro* e diferentes respostas de congelabilidade/vitrificação aos diferentes processos de criopreservação.

TAB. 3: Taxa de sobrevivência de embriões bovinos pós-desvitrificação e incubados a 38,5 °C, 5 % de CO₂ por 48 horas, de acordo com os diferentes meios de maturação e cultivos suplementados com agentes antioxidantes

TEMPO CULTIVO	CL	HA	VIT C	HA + VIT C	CC	TOTAL
0H	67	73	81	65	66	352
12H	34	43	44	40	43	204
24H	23	37	34	32	37	163
48H	16	24	10	8	22	80
TxSOBR_12 H	50,75a	58,90a	54,32a	61,54a	65,15a	57,95
TxSOBR_24 H	34,33a	50,68a	41,98a	49,23a	56,06a	46,31
TxSOBR_48 H	23,88a	32,88ab	12,35ac	12,31ac	33,33a	22,73

Valores médios seguidos por letras minúsculas na mesma linha, diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de qui-quadrado (1; 3,84); CL= meio de cultivo base sem complemento de agentes antioxidante; HA= meio de cultivo base suplementado com ácido hialurônico; VIT C= meio de cultivo base suplementado com vitamina C; HA_VIT C= meio de cultivo suplementado com vitamina C e ácido hialurônico; CC= meio de cultivo comercial; TOTAL= total de embriões; TxSOBR_12, 24 e 48 h= taxa de sobrevivência embriões por 12, 24 e 48 horas pós- desvitrificação e incubado a 38,5 °C, 5 % CO₂.

Com relação a capacidade de sobrevivência ao método de congelamento lento dos embriões produzidos *in vitro*, houve influência da adição de antioxidantes ao meio de maturação e cultivo *in vitro* (tabela 4). Após 24 horas de aquecimento, os valores médios obtidos para taxa de sobrevivência não diferiram entre si, nos tratamentos com meios comercial, meios bases suplementados com ácido hialurônico ou com vitamina C ($P > 0,05$) embora em valor absoluto obtido para o tratamento utilizando o meio comercial se mostrou muito satisfatório, quando comparado aos anteriormente citados com a suplementação de ácido hialurônico ou vitamina C. Contudo, o tratamento empregando o meio comercial apresentou maior

valor médio na taxa de sobrevivência que os meios do próprio laboratório e aquele suplementado com vitamina C (tabela 4). Após as 24 horas, a queda na taxa de sobrevivência se mostrou na mesma proporção entre todos os tratamentos, não sendo constatado diferença entre os tratamentos. Porém, após 48 horas de aquecimento, período maior de avaliação pós-aquecimento (tabela 4), os valores médios na taxa de sobrevivência de embriões no geral se mostraram muito baixa ou zero % de sobrevivência (8 %). Contudo, embora não se tenha constatado diferença dos valores médios obtidos nos tratamentos com meio comercial, os meios base suplementados com ácido hialurônico associado ou não com a vitamina C ($P > 0,05$), verificou-se que quando os oócitos e os embriões foram, respectivamente, maturados ou cultivados em meio comercial apresentaram maior resistência em valores absolutos, ao método de congelamento lento que os demais meios, inclusive diferindo significativamente com os tratamentos empregando meios do próprio laboratório e meio base suplementado com vitamina C ($P < 0,05$; tabela 4). Vale ressaltar que no presente estudo, avaliando a sobrevivência dos embriões após a criopreservação pelo método de congelamento lento, o número de embriões avaliados foi baixo, no qual, após a distribuição destes para cada tratamento, o número se tornou muito baixo para cada tratamento, dificultando assim a interpretação das análises realizadas.

TAB. 4: Taxa de sobrevivência de embriões bovinos após-descongelamento (método de congelamento lento) e incubados a 38,5 °C, 5 % de CO₂ por 48 horas, de acordo com os diferentes meios de maturação e cultivos suplementados com agentes antioxidantes

TEMPO CULTIVO	CL	HA	VIT C	HA + VIT C	CC	TOTAL
0H	16	11	14	19	15	75
12H	6	6	6	6	11	35
24H	6	5	3	4	5	23
48H	0	1	0	1	4	6
TxSOBR_12	37,50b	54,55bc	42,86bc	31,58b	73,33ac	42,67
TxSOBR_24	37,50a	45,45a	21,43a	21,05a	33,33a	30,67
TxSOBR_48	0,00b	9,09a	0,00b	5,26a	26,67a	8,00

Valores médios seguidos por letras minúsculas na mesma linha, diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de qui-quadrado (1; 3,84); CL= meio de cultivo base sem complemento de agentes antioxidante; HA= meio de cultivo base suplementado com ácido hialurônico; VIT C= meio de cultivo base suplementado com vitamina C; HA_VIT C= meio de cultivo suplementado com vitamina C e ácido hialurônico; CC= meio de cultivo comercial; TOTAL= total de embriões; TxSOBR_12, 24 e 48 h= taxa de sobrevivência embriões por 12, 24 e 48 horas pós- desvitrificação e incubado a 38,5 °C, 5 % CO₂.

Na tabela 5 estão sumariados o número de embriões descongelados ou desvitrificados e as taxas de sobrevivência embrionária geral e de acordo com os tratamentos com meios de maturação e cultivo *in vitro* com ou sem suplementação de antioxidantes. Houve diferença entre os métodos de criopreservação, sendo favorável ao método de vitrificação, independente dos meios suplementados ou não com ácido hialurônico associado ou não com a vitamina C. Os valores mais baixos obtidos pelo método de congelamento lento, provavelmente possibilita maiores lesões aos embriões, de modo que a partir de 24 horas de aquecimento, já há uma redução na sobrevivência de embriões (tabela 4). Embora seja necessário a desvitrificação dos embriões em laboratório e envasados para que seja enviado ao campo para que sejam inovulados, os resultados são muito satisfatórios, embora ainda baixo, necessitando a sequência de estudos no intuito de aperfeiçoar esta técnica para alcançar valores maiores de sobrevivência embrionária.

TAB. 5: Taxa de sobrevivência de embriões bovinos após-descongelamento (método de congelamento lento e vitrificação) e incubados a 38,5 °C, 5 % de CO₂ por 48 horas, de acordo com os diferentes meios de maturação e cultivos suplementados com agentes antioxidantes

TEMPO CULTIVO	CL	HA	VIT C	HA + VIT C	CC	TOTAL
0 horas						
Vitrificação	67	73	81	65	66	352
Congelamento lento	16	11	14	19	15	75
48 horas						
Vitrificação	16	24	10	8	22	80
Congelamento lento	0	1	0	1	4	6
TxSOBR_48_Vitri	23,88 ^a	32,88 ^a	12,35 ^a	12,31 ^a	33,33 ^a	22,73 ^a
TxSOBR_48_Lento	0 ^b	9,09 ^a	0 ^a	5,26 ^a	26,67 ^a	8,00 ^b

Valores médios seguidos por letras minúsculas na mesma coluna, diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de qui-quadrado (1; 3,84); CL= meio de cultivo base sem complemento de agentes antioxidante; HA= meio de cultivo base suplementado com ácido hialurônico; VIT C= meio de cultivo base suplementado com vitamina C; HA_VIT C= meio de cultivo suplementado com vitamina C e ácido hialurônio; CC= meio de cultivo comercial; TxSOBR_48 h_Vitri ou Lento= taxa de sobrevivência embriões após 48 horas após- desvitrificação ou descongelamento.

5. CONCLUSÕES

A adição dos antioxidantes ácido hialurônico (0,5 mg/mL) e vitamínica C (50 µg/mL), individualmente ou associados não influencia a produção *in vitro* total de embriões, porém, se mostram relacionados a maior quantidade de embriões nos estádios de desenvolvimento de blastocistos expandidos, blastocistos em eclosão e blastocistos eclodidos;

De acordo com a metodologias empregadas para criopreservação de embriões, a vitrificação apresenta vantagens ao congelamento lento;

A taxa de sobrevivência dos embriões pós-descongelamento não é influenciada pela adição de antioxidantes nos meios de maturação e de cultivo de embriões submetidos ao método de congelamento lento;

A adição de ácido hialurônico em meios de maturação e cultivo *in vitro* está relacionada positivamente à taxa de sobrevivência dos embriões criopreservados pelo método de vitrificação.

REFERÊNCIAS

ALVES, C.S.; FURTADO, R.A.; NASCENTES, G.A.N.; RUMPF, R.; TAVARES, D.C. Avaliação dos efeitos da Melatonina sobre a produção de embriões bovinos obtidos por fecundação *in vitro* e transferência nuclear de células somáticas. **Revista Brasileira Reprodução Animal**. v. 43, n .4, p. 815-823, out. /dez. 2019.

AMSTISLAVSKY, S.; MOKROUSOVA V.; BRUSENTSEV, E.; OKOTRUB, K.; COMIZZOLI, P. Influence of Cellular Lipids on Cryopreservation of Mammalian Oocytes and Preimplantation Embryos: A Review. **Bio Preservation and Biobanking**, v. 17, n. 1, 2019.

BLOCK, J.; BONILLA, L.; HANSEN, P.J. Effects of addition of hyaluronan to embryo culture medium on survival of bovine embryos *in vitro* following vitrification and establishment of pregnancy after transfer to recipients. **Theriogenology**, v. 71, p. 1063-1071, 2009.

CARRILHO, D. **Comparação Entre o Congelamento Lento e a Vitrificação na Criopreservação de Tecido Ovariano de Suínos**, 2013. 71 f. Tese (Livre Docência) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Distrito Federal.

CHASOMBAT J.; NAGAI, T.; PARNPAI, R.; VONGPRALUB, T. Pretreatment of *in vitro* matured bovine oocytes with docetaxel before vitrification: Effects on cytoskeleton integrity and developmental ability after warming. *Cryobiology*, 2015; 71:216-23

CHILLON, L.F.; WALKER, D. J.; SANCHEZ, J.F.T.; SEIDEL JR, G.E.; In vitro assessment of a direct transfer vitrification procedure for bovine embryos. **Theriogenology**, v.65, p. 1200-1214, 2006.

DIEZ C., DUQUE P., GÓMEZ E., HIDALGO C. H., TAMARGO C., RODRÍGUEZ A., FERNÁNDEZ L, VARGA S DE LA, FERNÁNDEZ A, FACAL N., CARBAJO M. Bovine oocyte vitrification before or after meiotic arrest: effects on ultrastructure and developmental ability. **Theriogenology**, 2005; 64:317-33.

DE LOSS F., KASTROP P., VAN MAURYK., VANBENEDEN T. H., KRUIPT.A. Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocyte complexes. **Molecular Reproductive Development**. v. 28, p. 255-259, 1991.

DODE M.A.N.; LEME L.O.; SPRÍCIGO J.F.W.; Cryopreservation of in vitro produced bovine embryos, **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Vol. 37, no. 2, p.145-150, abr./jun. 2013.

ENWISTLE, J.; HALL, C. L.; E. A. TURLEY E. A.; HA receptors: regulators of signaling to the cytoskeleton. **Journal of Cellular Biochemistry**, vol. 61, no. 4, pp. 569–577, 1996.

FURNUS CC, de Matos DG, Martinez AG. **Effect of hyaluronic acid n developoment of in vitro produced bovine embryos**. **Theriogenology**, 1998, 49: 1489-99.

GONÇALVES, R.L.R.; VIANA, J. H. M. Situação atual da produção de embriões bovinos no Brasil e no mundo. **In:** Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA 2019); Gramado, RS, 15 a 17 de maio de 2019.

GORDON, I. **Laboratory Production of Cattle Embryos**, 2ª Ed., Cambridge, CAB International University Press, 2003.

GUNTER, K. K.; GUNTER, T. E. Transport of calcium by mitochondria. **Journal of Bionergetics and Biomembranes**, v.26, p.471-485, 1994.

GUTNISKY, C.; MORADO, S.; GADZE, T.; DONATO, A.; ALVAREZ, G.; DALVIT, G.; CETICA, P.; Morphological, biochemical and functional studies to evaluate bovine oocyte vitrification. *Theriogenology*, v. 143, p. 18-26, 2020.

KANEKO, T.; SAITO, H.; TOYA, M.; SATIO, T.; NAKAHARA, K.; Hiroi, M.; Hyaluronic acid inhibits apoptosis in granulosa cells via CD44, **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, vol. 17, no. 3, pp. 162–167, 2000.

KNUDSON, W.; AGUIAR, D. J.; HUA, Q.; KNUDSON, C. B.; CD44-anchored hyaluronan-rich pericellular matrices: an ultrastructural and biochemical analysis, **Experimental Cell Research**, vol. 228, no. 2, pp. 216–228, 1996.

KNUDSON, C. B.; KNUDSON, W.; Hyaluronan-binding proteins in development, tissue homeostasis, and disease, **The FASEB Journal**, vol. 7, no. 13, pp. 1233–1241, 1993.

LEMOS, P. F. B. **A Viabilidade de embriões caprinos e ovinos produzidos *in vivo* após criopreservação utilizando etilenoglicol, dimetilsulfóxido e dimetilformamida**, 2010. 112 f. Tese (Livre Docência) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco.

LIMA, M. R. **Efeitos de reguladores do metabolismo lipídico no desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos e na sobrevivência à**

vitrificação, 2015. 74 f. Tese (Livre Docencia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal/SP.

LUNA, H. S.; FERRARI, I.; RUMPF, R.; Influence of stage of maturation of bovine oocytes at time of vitrification on the incidence of diploid metaphase II at completion of maturation. *Animal Reproduction Science*; p. 62:23-8.

MAHANI, I. M.; DAVAR, R. Hyaluronic acid versus albumin in human embryo transfer médium. **La Revue de Santé de la Méditerranée**, v. 13, n. 4, 2007.

MAREI, W.F.; GHAFARI, F.; FOULADI-NASHTA, A. A. Role of hyaluronic acid in maturation and further early embryo development of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.78, n.3, p.670-677, 2012.

NETTO, S.B.S. **Efeito da fonte proteica na produção, qualidade e crioresistencia de embriões bovinos produzidos in vitro**, 2016. 89 f. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília/DF.

PALMERINI, M. G.; ANTINORI, M.; CERUSICO, F.; VERSACI, C.; S. A.; MACCHIARELLI, G.; KHALILI, M. A.; ANTINORI, S. Ultrastructure of immature and mature human oocytes after cryotop vitrification. **Journal Reproduction Development**, v. 60, p. 411-420. 2014.

PEREIRA, R.M.; CARVALHAIS, I.; PIMENTA, J.; BAPTISTA, M. C.; VASQUES, M. I.; HORTA, A.E.M.; SANTOS, I. C.; MARQUES, M. R.; REIS, A.; PEREIRA, M.S.; MARQUES, C.C. Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by *trans10*, *cis12* conjugated linoleic acid supplementation during in vitro embryo culture. *Animal Reproduction Science*, v. 106, p. 322-332, 2008.

PEREIRA, S. A. **Efeito da Presença da Insulina-Transferrina-Selênio (ITS) e L-ácido Ascórbico (AA) na Produção in vitro de Embriões Bovinos**, 2013. 87 f.

Tese (Livre Docência) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Distrito Federal.

SAEGUSA, M.; HASHIMURA, M.; OKAYASU, I.; CD44 expression in normal, hyperplastic, and malignant endometrium, **The Journal of Pathology**, vol. 184, no. 3, pp. 297–306, 1998.

ROMEK, M.; GADJA, B; RZYSZTOFOWICZ, E.; KUCIA, M.; UZAROWSKA, A.; SMORAG, Z.; Improved quality of porcine embryos cultured with hyaluronan due to the modification of the mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species level. **Theriogenology**, v.102, p. 1-9, 2017.

SILVEIRA, M. M **Viabilidade de embriões bovinos produzidos in vitro transportados por diferentes tempos em meio de manutenção com antioxidantes**, 2019. 60 f. Tese (Livre Docência) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Rio Verde, Rio Verde, Goiás.

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

SOVERNIGO, T. C **Uso de antioxidantes na produção in vitro de embriões bovinos**, 2015. 50 f. Tese (Livre Docência) – Universidade Norte do Paraná, Paraná.

SUCCU, S.; LEONI, G. G.; BEBBERE, D., BERLINGUER, B.; MOSSA, F.; BOGLIOLO, L.; MADEDDU, M. .; LEDDA, S.; NAITANA, S. Vitrification devices affect structural and molecular status of in vitro matured ovine oocytes. **Molecular Reproduction Development**, v.74, p. 1337- 1344. 2007

THOMAS, L.; BYERS, H. R.; VINK, J.; STAMENKOVIC, I.; CD44H regulates tumor cell migration on hyaluronate-coated substrate, **The Journal of Cell Biology**, vol. 118, no. 4, pp. 971–977, 1992.

YOKOO, M.; KIMURA, N. and SATO, E.; Induction of oocyte maturation by hyaluronan-CD44 interaction in pigs, **Journal of Reproduction and Development**, vol. 56, no. 1, pp. 15–19, 2010.

WANG, L.; ZHANG, H.; WANG, Y. et al. Peroxiredoxin5 is essential for *in vitro* development of bovine SCNT embryos. **Theriogenology**, v. 92, p.156-166, 2017.

ZENON Y., PEARL M., BOROCHOV A. & ARAV A. Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature bovine oocytes. **Cryobiology**, v. 38, p 35-42, 1999.