

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Escola de Veterinária**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

**Viviane Luzia da Silva Feuchard**

**PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E  
CRIOSOBREVIVÊNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS PÓS-VITRIFICAÇÃO**

Belo Horizonte  
2023

**Viviane Luzia da Silva Feuchard**

**PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E  
CRIOSOBREVIVÊNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS PÓS-VITRIFICAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área: Reprodução Animal  
Orientadora: Profa. Dra. Letícia Zoccolaro  
Oliveira  
Coorientadora: Dra. Clara Slade Oliveira  
Coorientadora: Dra. Naiara Zoccal Saraiva

Belo Horizonte

2023

F422p Feuchard, Viviane Luzia da Silva, 1994 -  
Produção de espécies reativas de oxigênio e criosobrevivência de embriões  
bovinos pós-vitrificação / Viviane Luzia da Silva Feuchard. – 2023.  
63f: il

Orientadora: Leticia Zoccolaro Oliveira  
Coorientadoras: Clara Slade Oliveira  
Naiara Zoccal Saraiva

Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da  
UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.  
Bibliografias: f. 49 a 63.

1- Bovino – Reprodução - Teses – 2. Criopreservação – Teses –  
3. Reprodução animal – Teses - I. Oliveira, Leticia Zoccolaro – II. Oliveira, Clara  
Slade – III. Saraiva, Naiara Zoccal - IV. Universidade Federal de Minas Gerais,  
Escola de Veterinária – V. Título.

CDD – 636.4

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569  
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO - VIVIANE LUZIA DA SILVA FEUCHARD**

Às 14:00 horas do dia 14 de junho de 2023, reuniu-se, na Escola de Veterinária da UFMG a Comissão Examinadora de Dissertação, para julgar, em exame final, a defesa da dissertação intitulada:

**“PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E CRIOSOBREVIVÊNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS PÓS-VITRIFICAÇÃO”**

Como requisito final para a obtenção do Grau de **Mestre em Ciência Animal**, área de concentração em **Reprodução animal**. Abrindo a sessão, o(a) Presidente da Comissão, **Leticia Zoccolaro Oliveira**, após informar o aos presentes o teor das Normas Regulamentares da Defesa de Dissertação, passou a palavra ao candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento da dissertação, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

Examinador / Prof. (a) / Dr. (a)	Aprovado(a)	Reprovado(a)
Leticia Zoccolaro Oliveira	X	
Naiara Zoccal Saraiva	X	
Clara Slade Oliveira	X	
Maria Clara Caldas Bussiere	X	
Alan Maia Borges	X	

Face os resultados, o (a) aluno (a) foi considerado(a):

Aprovado(a)	X	Reprovado(a)	
-------------	---	--------------	--

Para concluir o Mestrado, o(a) candidato(a) deverá entregar a versão final da dissertação, acatando, se houver, as modificações sugeridas pela banca, e a comprovação de submissão de pelo menos um artigo científico em periódico recomendado pelo Colegiado dos Cursos. Para tanto, terá o prazo máximo de 60 dias a contar da data da defesa.

O resultado final, foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo(a) Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o(a) Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 14 de junho de 2023.

Assinatura dos membros da banca:



Documento assinado eletronicamente por **Leticia Zoccolaro Oliveira, Professora do Magistério Superior**, em 14/06/2023, às 17:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alan Maia Borges, Professor do Magistério Superior**, em 16/06/2023, às 09:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Naiara Zoccal Saraiva, Usuária Externa**, em 21/06/2023, às 09:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Clara Slade Oliveira, Usuário Externo**, em 21/06/2023, às 16:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Clara Caldas Bussiere, Usuária Externa**, em 26/06/2023, às 10:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2369552** e o código CRC **CFD8C71F**.

Dedico este trabalho a minha mãe Suely,  
pois sempre me apoiou e esteve ao meu  
lado em todos os momentos.

## **AGRADECIMENTOS**

Inicialmente, gostaria de agradecer a minha mãe Suely por sempre estar ao meu lado, dando bons conselhos e me incentivando a superar as dificuldades que surgem ao longo do caminho.

Ao meu namorado, Paulo Sérgio, agradeço pela companhia tanto nos momentos bons quanto nos ruins.

A minha orientadora, Letícia Zoccolaro Oliveira, agradeço por todo incentivo dado durante o mestrado, pelas contribuições ao trabalho e pela oportunidade de fazer parte do seu grupo durante esse período.

A minha coorientadora, Clara Slade Oliveira, agradeço pela oportunidade de fazer parte de sua equipe. Além disso, pela confiança, contribuições ao trabalho e auxílio, que tornaram possível a elaboração do mesmo.

A minha coorientadora, Naiara Zoccal Saraiva, pelas contribuições ao trabalho.

Aos membros da banca, pelas sugestões propostas e colaboração para o enriquecimento do trabalho.

A Embrapa Gado de Leite por conceder a estrutura e materiais necessários para a elaboração do presente estudo.

Agradeço também a equipe do Laboratório de Reprodução Animal (Juiz de Fora) pelo auxílio durante a execução dos experimentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

A reduzida taxa de sobrevivência alcançada após o aquecimento de embriões vitrificados representa um grande problema para a disseminação do uso da criopreservação. Nesse contexto, os objetivos do presente estudo foram: (1) investigar as concentrações de espécies reativas de oxigênio e a geração de estresse oxidativo em blastocistos frescos e vitrificados aquecidos e (2) se a atenuação do estresse oxidativo, por meio do cultivo pós-aquecimento com (+) e sem (-) beta-mercaptoetanol (100  $\mu$ M), poderia melhorar a sobrevivência (reexpansão e eclosão), o índice oxidativo e a qualidade de embriões vitrificados. No experimento I, os embriões foram segregados em dois grupos: embriões frescos (F) e embriões vitrificados aquecidos (V). No experimento II, os blastocistos frescos e vitrificados foram segregados em quatro grupos experimentais: fresco cultivado com antioxidante (F+), fresco cultivado sem antioxidante (F-), vitrificado aquecido cultivado com antioxidante (V+) e vitrificado aquecido cultivado sem antioxidante (V-). Os resultados mostraram que as concentrações de espécies reativas de oxigênio foram superiores ( $P < 0,05$ ) em embriões vitrificados (103,7 $\pm$ 8,7 média de pixels) quando comparado aos embriões frescos (57,3 $\pm$ 4,2 média de pixels). Por outro lado, a taxa de reexpansão dos embriões V+ e V- foi semelhante ( $P > 0,05$ ) em todos os momentos avaliados (0 h: V+ = 63,9%, V- = 62,6%; 2 h: V+ = 90,4%, V- = 95,6%; 4 h: V+ = 92,8%, V- = 98,9%). A taxa de eclosão dos embriões V+(49,4%) e V- (48,1%) foi semelhante ( $P > 0,05$ ) àquela observada em embriões F- (65,7%). O índice oxidativo presente nos embriões também não diferiu entre os grupos experimentais ( $P > 0,05$ ). No entanto, os embriões V+ (148,0 $\pm$ 7,3) apresentaram número total de células similar aos embriões F- (158,0 $\pm$ 14,5) e F+ (163,2  $\pm$  9,2), ao passo que embriões V- (117,4  $\pm$  5,5) apresentaram menor ( $P < 0,05$ ) número de células em comparação aos demais grupos experimentais. Conclui-se que a vitrificação e o aquecimento elevam as concentrações de espécies reativas de oxigênio em embriões vitrificados e que, embora a atenuação do estresse oxidativo com beta-mercaptoetanol não tenha resultado em melhores taxas de sobrevivência embrionária, contribuiu para melhorar o número total de células, um indício de maior qualidade dos embriões vitrificados.

Palavras-chave: antioxidante; blastocisto; criopreservação; cultivo embrionário; estresse oxidativo.

## ABSTRACT

The reduced survival rate achieved after warming vitrified embryos represents a major problem for the dissemination of the use of cryopreservation. In this context, the objectives of the present study were: (1) to investigate the concentrations of reactive oxygen species and the generation of oxidative stress in fresh and warmed vitrified blastocysts and (2) whether the attenuation of oxidative stress, through post-warming cultivation with (+) and without (-) beta-mercaptoethanol (100  $\mu$ M), could improve survival (re-expansion and hatching), oxidative index and quality of vitrified embryos. In experiment I, embryos were separated into two groups: fresh embryos (F) and warmed vitrified embryos (V). In experiment II, fresh and vitrified blastocysts were separated into four experimental groups: fresh cultured with antioxidant (F+), fresh cultured without antioxidant (F-), warmed vitrified cultured with antioxidant (V+) and warmed vitrified cultured without antioxidant (V-). The results showed that the concentrations of reactive oxygen species were higher ( $P < 0,05$ ) in vitrified embryos ( $103,7 \pm 8,7$  pixels mean) when compared to fresh embryos ( $57,3 \pm 4,2$  pixels mean). On the other hand, the rate of re-expansion of the V+ and V- embryos was similar ( $P > 0,05$ ) in all evaluated moments (0 h: V+ = 63,9%, V- = 62,6%; 2 h: V+ = 90,4%, V- = 95,6%; 4 h: V+ = 92,8%, V- = 98,9%). The hatching rate of V+ (49,4%) and V- (48,1%) embryos was similar ( $P > 0,05$ ) to that observed in F- embryos (65,7%). The oxidative index present in the embryos also did not differ between the experimental groups ( $P > 0,05$ ). However, V+ embryos ( $148,0 \pm 7,3$ ) showed a similar total number of cells to F- ( $158,0 \pm 14,5$ ) and F+ ( $163,2 \pm 9,2$ ) embryos, whereas embryos V- ( $117,4 \pm 5,5$ ) had a smaller number of cells ( $P < 0,05$ ) compared to the other experimental groups. It is concluded that vitrification and warming increase the concentrations of reactive oxygen species in vitrified embryos and that, although the attenuation of oxidative stress with beta-mercaptoethanol did not result in better embryonic survival rates, it contributed to improve the total number of cells, an indication of higher quality of vitrified embryos.

Keywords: antioxidant; blastocyst; cryopreservation; embryo culture; oxidative stress.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática do experimento I.....	33
Figura 2. Representação esquemática do experimento II .....	34
Figura 3. Efeito da vitrificação e aquecimento na produção intracelular de espécies reativas de oxigênio em embriões criopreservados.....	39
Figura 4. Taxa de reexpansão de blastocistos vitrificados aquecidos cultivados com e sem BME após o aquecimento.....	40
Figura 5. Taxa de eclosão de embriões frescos e vitrificados submetidos ao cultivo pós-aquecimento.....	41
Figura 6. Índice oxidativo de blastocistos frescos e vitrificados .....	42
Figura 7. Número total de células de blastocistos frescos e vitrificados .....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS

BME= Beta-mercaptoetanol

BSP = Proteínas de união espermática

CAT = Catalase

CIV = Cultivo *in vitro*

DNA = Ácido Desoxirribonucleico

EROS = Espécies reativas de oxigênio

FIV = Fertilização *in vitro*

FSH = Hormônio folículo-estimulante

GPx = Glutathione peroxidase

GSH = Glutathione

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = Peróxido de hidrogênio

h = Hora

LH = Hormônio luteinizante

MIV = Maturação *in vitro*

μL = Microlitro

mL = Mililitro

MII = Metáfase II

OH° = Radical hidroxila

O<sub>2</sub> = Oxigênio

O<sub>2</sub><sup>-</sup> = Radical superóxido

p = Valor de significância

PBS = Tampão fosfato-salino

pH = Potencial hidrogeniônico

PIV = Produzido *in vitro*

PIVE = Produção *in vitro* de embriões

Prxs = Peroxirredoxinas

RA = Reação acrossômica

RNA = Ácido ribonucleico

SFB = Soro fetal bovino

SOD = Superóxido dismutase

SOF = Fluido sintético de oviduto

TCM = Meio de cultivo de tecidos

ZP2 = Receptor de zona pelúcida 2

°C = Graus Celsius

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>Produção <i>in vitro</i> de embriões .....</b>	<b>16</b>
2.1.1	Maturação oocitária .....	16
2.1.2	Fertilização <i>in vitro</i> .....	18
2.1.3	Cultivo <i>in vitro</i> .....	20
<b>2.2</b>	<b>Criopreservação de embriões .....</b>	<b>21</b>
2.2.1	Crioprotetores .....	22
2.2.2	Metodologias de criopreservação .....	23
2.2.3	Vitrificação .....	24
<b>2.3</b>	<b>Estresse oxidativo.....</b>	<b>25</b>
2.3.1	Espécies reativas de oxigênio .....	25
2.3.2	Papel das EROs no desenvolvimento embrionário.....	26
2.3.3	Condições de cultivo <i>in vitro</i> e produção de EROs.....	27
<b>2.4</b>	<b>Antioxidantes.....</b>	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>HIPÓTESES.....</b>	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>Experimento I.....</b>	<b>31</b>
<b>3.2</b>	<b>Experimento II.....</b>	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
<b>4.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>31</b>
<b>4.2</b>	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>31</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
<b>5.1</b>	<b>Local do experimento e obtenção de gametas .....</b>	<b>32</b>
<b>5.2</b>	<b>Delineamento experimental .....</b>	<b>32</b>
<b>5.3</b>	<b>Meios de cultivo e reagentes.....</b>	<b>34</b>
<b>5.4</b>	<b>Condições experimentais.....</b>	<b>34</b>
<b>5.5</b>	<b>Coleta de oócitos e maturação <i>in vitro</i> .....</b>	<b>35</b>
<b>5.6</b>	<b>Fertilização e cultivo <i>in vitro</i>.....</b>	<b>35</b>
<b>5.7</b>	<b>Vitrificação e aquecimento de embriões .....</b>	<b>35</b>
<b>5.8</b>	<b>Cultivo pós-aquecimento.....</b>	<b>36</b>
<b>5.9</b>	<b>Concentração de espécies reativas de oxigênio. ....</b>	<b>37</b>
<b>5.10</b>	<b>Número total de células .....</b>	<b>37</b>
<b>5.11</b>	<b>Índice oxidativo .....</b>	<b>37</b>
<b>5.12</b>	<b>Análise estatística .....</b>	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
<b>6.1</b>	<b>Experimento I.....</b>	<b>38</b>
<b>6.2</b>	<b>Experimento II.....</b>	<b>40</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO. ....</b>	<b>48</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>49</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As tecnologias de reprodução assistida têm apresentado grande progresso na espécie bovina nos últimos anos (Ferré *et al.*, 2019). Nesse contexto, a utilização da produção *in vitro* de embriões (PIVE) se mostrou uma ferramenta de grande utilidade sob o ponto de vista comercial e científico (Carvalho *et al.*, 2011) uma vez que é empregada tanto em programas voltados ao melhoramento animal (Soto-Heras e Paramio, 2020) quanto em pesquisas científicas (Ealy *et al.*, 2019).

Com o emprego dessa biotecnologia em larga escala foi possível elevar o número de embriões produzidos por intervalo de tempo (Varago *et al.*, 2008). Assim, a criopreservação de embriões tornou-se um procedimento de rotina nos laboratórios de produção *in vitro* e, entre as metodologias desenvolvidas até o momento, a vitrificação se destaca como o procedimento mais utilizado para criopreservar tanto oócitos quanto os embriões oriundos dessa biotécnica (Gutnisky *et al.*, 2020; Ohata *et al.*, 2021; Somfai *et al.*, 2023). Contudo, os embriões produzidos *in vitro* (PIV) apresentam algumas alterações morfológicas, como alto conteúdo lipídico e mudança na composição da membrana plasmática, que os tornam menos criotolerantes em relação aos seus correspondentes *in vivo* (Abe *et al.*, 2002; Sudano *et al.*, 2012) e mais sensíveis aos efeitos do estresse oxidativo (Ambruosi *et al.*, 2009). Por essa razão, a sobrevivência embrionária alcançada após a vitrificação, embora seja melhor que aquela obtida com o congelamento lento (Caamaño *et al.*, 2015), ainda encontra-se abaixo do desejado.

Sabe-se que durante o metabolismo celular aeróbico ocorre a síntese de espécies reativas de oxigênio (EROs) e que essas moléculas são importantes em diversos processos de sinalização celular quando presentes em níveis fisiológicos (Mittler *et al.*, 2011). Entretanto, durante a produção *in vitro*, oócitos e embriões são expostos a um ambiente não fisiológico que, por sua vez, apresenta fatores pró-oxidantes (temperatura, meio de cultivo, exposição à luz, tensão de oxigênio, criopreservação) que podem favorecer a formação dessas moléculas em excesso (López-Damián *et al.*, 2020; Soto-Heras e Paramio, 2020). Além disso, já foi demonstrado que a vitrificação de embriões está relacionada com a redução dos níveis intracelulares de glutathiona (Gaviria *et al.*, 2019), que parece ser o principal mecanismo de defesa antioxidante não enzimático presente nos embriões (Takahashi *et al.*, 1993; Gardiner *et al.*, 1998). Assim, o desbalanço entre a síntese dessas moléculas e os mecanismos de defesa antioxidante induz ao desenvolvimento do estresse oxidativo (Betteridge, 2000) e,

consequentemente, as EROs acabam por causar danos sobre diversos constituintes celulares, como lipídios, ácidos nucleicos e proteínas (Halliwell, 2011), resultando na redução da viabilidade do embrião.

A utilização de antioxidantes exógenos tem sido proposta com o intuito de melhorar a qualidade desses embriões, visando aumentar sua criotolerância (Moussa *et al.*, 2020; De Mattos *et al.*, 2022). Nesse contexto, compostos tióis, apresentando baixo peso molecular, como o beta- mercaptoetanol, cisteína, cistina e cisteamina têm sido empregados nos meios de cultivo embrionário (Hosseini *et al.*, 2009; De Mattos *et al.*, 2022). A literatura tem demonstrado que a utilização do beta-mercaptoetanol melhora a capacidade antioxidante dos embriões por meio do aumento dos níveis intracelulares de glutathione (De Matos e Furnus, 2000; Takahashi *et al.*, 2002) que, por sua vez, ocorre pela redução da cistina a cisteína (Issels *et al.*, 1988). Entretanto, ainda não é muito estudada a relação entre as concentrações de espécies reativas de oxigênio e a viabilidade embrionária pós-aquecimento.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar o papel da vitrificação e aquecimento na produção de espécies reativas de oxigênio e avaliar se a utilização do antioxidante beta-mercaptoetanol poderia aumentar a criosobrevivência e a qualidade de embriões bovinos após a vitrificação.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Produção *in vitro* de embriões

Embora pesquisas voltadas para o estudo da fertilização *in vitro* (FIV) tenham iniciado antes da década de 1980 em diversas espécies (Sjunnesson, 2020), na espécie bovina, o relato de nascimento de descendente oriundo de produção *in vitro* (PIV) ocorreu somente em 1981, por meio do entendimento dos aspectos morfofisiológicos relacionados à fertilização e desenvolvimento embrionário inicial (Brackett *et al.*, 1981). Assim, a PIVE passou a ser vista como uma alternativa a outras biotécnicas já amplamente utilizadas como a inseminação artificial e superovulação, para a produção de embriões (Brackett *et al.*, 1981; Seidel, 1981; Viana *et al.*, 2010). Conseqüentemente, em bovinos, a PIVE passou a ser empregada com o intuito de maximizar a utilização de animais valiosos (Brackett, 1982; Berglund, 2008), sem o comprometimento da vida reprodutiva dos mesmos (Bousquet *et al.*, 1999).

Ainda que essa biotecnologia seja amplamente utilizada atualmente com foco comercial, tem se mostrado de grande interesse sob o ponto de vista acadêmico/científico (Vajta *et al.*, 1996) e consagrou-se como uma biotécnica fundamental não só para o entendimento de diversos eventos biológicos envolvidos na reprodução, como também uma excelente fonte de embriões para uso em outras biotecnologias como a transferência nuclear de células somáticas, edição gênica e estudos com células-tronco (Gordon, 2003; Bouquet e Juga, 2013; Choudhary *et al.*, 2016).

Sob o ponto de vista comercial, essa biotecnologia oferece inúmeras vantagens que contribuem para o aumento da eficiência reprodutiva dos animais, pois permite a utilização de fêmeas jovens, adultas ou idosas, inférteis (quando se trata de patologia adquirida), otimiza a utilização de sêmen de touros valiosos, contribui para a redução do tempo entre gerações, acelera o melhoramento genético, facilita o comércio internacional e ainda permite a criação de bancos de embriões criopreservados (Brackett, 1982; Gonçalves *et al.*, 2007; Bouquet e Juga, 2013; Ferré *et al.*, 2019).

#### 2.1.1 Maturação oocitária

A maturação *in vitro* (MIV) corresponde a primeira etapa da PIVE e é a fase na qual o oócito, ainda imaturo, passa por uma série de transformações por meio das quais torna-se capaz de ser fertilizado e competente para manter o desenvolvimento embrionário subsequente

(Landim-Alvarenga e Maziero, 2014). Para isso, a MIV precisa permitir que os principais eventos fisiológicos, que ocorrem simultaneamente e estão interligados, ocorram adequadamente: a maturação nuclear e citoplasmática (Ferreira *et al.*, 2009).

*In vivo*, a maturação ocorre em resposta ao pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH) no oócito meioticamente competente, contido no folículo dominante (Norris *et al.*, 2008; Araújo *et al.*, 2014). Antes do pico de LH, a inibição da maturação do oócito é mantida pelo fator inibidor de maturação (OMI) (Sirard *et al.*, 1998), produzido pelas células da granulosa (Palhares, 2020). Entretanto, conforme os folículos se desenvolvem e a concentração de LH aumenta, a concentração de OMI começa a reduzir (Palhares, 2020).

Assim, após o pico de LH, ocorre uma mudança na síntese de hormônios esteroides pelas células da granulosa e também a produção de ácido hialurônico pelas células do *cumulus*, levando a mucificação/expansão de suas células e rompimento das junções (*gap*) entre as células do *cumulus* e o oócito (Picton *et al.*, 1998; Araújo *et al.*, 2014). Como consequência do rompimento das junções *gap*, o suprimento de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), oriundo das células da granulosa, em direção ao oócito fica prejudicado, reduzindo as concentrações do mesmo no oócito (Carabatsos *et al.*, 2000). Conseqüentemente, ocorre a ativação do fator promotor de maturação (MPF) (Jones, 2004) e a meiose é reiniciada.

Durante a maturação nuclear, o oócito inicia seu processo meiótico progredindo da prófase I até a metáfase II (MII) (Roelen, 2020; Seneda *et al.*, 2021). Ao alcançar o estágio de MII, os oócitos cessam novamente o processo meiótico até o momento da fertilização, quando a meiose é retomada e ocorre a extrusão do segundo corpúsculo polar (Seneda *et al.*, 2021). No ambiente *in vitro*, por outro lado, a retomada da meiose ocorre logo após a retirada dos oócitos dos folículos antrais (Edwards, 1965; Mello *et al.*, 2016).

Na maturação citoplasmática ocorrem modificações nos oócitos tanto em nível estrutural quanto molecular que, em conjunto com a maturação do núcleo (do estágio de vesícula germinativa até a MII), permitirão o desenvolvimento do futuro embrião. Com relação às mudanças estruturais, durante a maturação citoplasmática, ocorre a migração das organelas celulares (mitocôndrias, complexo de Golgi, grânulos corticais e retículo endoplasmático) a fim de atender as demandas da célula de acordo com a sua fase de desenvolvimento, e tal mudança é atribuída à ação de microfilamentos e microtúbulos do citoesqueleto (Ferreira *et al.*, 2009; Landim-Alvarenga e Maziero, 2014).

Dessa forma, organelas inicialmente localizadas na periferia de oócitos imaturos, como as mitocôndrias, tendem a se deslocar em direção ao núcleo, enquanto os grânulos

corticais, presentes na região central do gameta, migram em direção à periferia do mesmo (Hyttel *et al.*, 1986; Cran e Moor, 1990). As mitocôndrias se deslocam para locais com alta demanda energética e produzem o ATP necessário para a síntese de proteínas que serão utilizadas durante o desenvolvimento tardio dos embriões (Meirelles *et al.*, 2004). Os grânulos corticais (estruturas originadas a partir do Complexo de Golgi) estarão posteriormente envolvidos no bloqueio à poliespermia no momento da fecundação sendo, portanto, fundamental sua presença na periferia do gameta (Wessel *et al.*, 2001; Landim-Alvarenga e Maziero, 2014). Da mesma forma, o retículo endoplasmático, distribuído de forma homogênea no citoplasma no estágio de vesícula germinativa, tende a deslocar-se para a periferia do oócito (Stricker, 2006; Ferreira *et al.*, 2009) e possui um papel importante na ativação oocitária, no momento da fertilização, devido a liberação de  $Ca^{2+}$  intracelular, permitindo, portanto, o início do desenvolvimento embrionário (Ferreira *et al.*, 2009).

A fim de mimetizar a maturação oocitária que ocorre *in vivo*, oócitos imaturos, retirados dos folículos antrais (3 a 8 mm), são cultivados no meio de cultivo de tecidos 199 (TCM 199), considerado padrão para a MIV. Para isso, o TCM 199 é suplementado com bicarbonato de sódio, soro fetal bovino (SFB), aminoácidos, gonadotrofinas (LH e FSH), estradiol e antibióticos (Gordon, 2003). A maturação dos oócitos geralmente é realizada em microgotas de 100  $\mu$ l de meio de maturação, durante o período de 22 a 24 horas a 38,5°C, em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturada (Bahrami *et al.*, 2019; Arias *et al.*, 2022).

### 2.1.2 Fertilização *in vitro*

A fertilização *in vitro* (FIV) consiste na segunda etapa da PIVE. É a etapa na qual o co-cultivo de gametas resulta na formação de um indivíduo diploide, o zigoto.

Após a maturação, os oócitos encontram-se aptos a serem fertilizados, mas, para isso, os espermatozoides devem primeiro passar pela capacitação para adquirirem a capacidade de se ligarem à zona pelúcida e fertilizarem o oócito (Rodriguez-martinez, 2007; Stival *et al.*, 2016).

*In vivo*, o processo de capacitação espermática ocorre no interior do trato reprodutivo feminino (Ickowicz *et al.*, 2012). No momento da ejaculação, os espermatozoides são expostos às proteínas presentes no plasma seminal (BSPs) que, por sua vez, se aderem e contribuem para a estabilização da membrana espermática (Gordon, 2003). Durante a capacitação, substâncias como lipoproteínas de alta densidade, albumina e glicosaminoglicanos removem as BSPs presentes na membrana espermática e, com isso, favorecem a saída do colesterol (Parrish *et al.*,

1988; Travis e Kopf, 2002; Gordon, 2003). Assim, ocorre uma mudança na proporção de colesterol/fosfolípidios da membrana modificando sua fluidez e a permeabilidade aos íons bicarbonato e cálcio (Kopf *et al.*, 1999, Hernández-Gonzalez *et al.*, 2006). Essas modificações favorecem o aumento das concentrações desses íons (Cormier *et al.*, 1997), de adenosina monofosfato cíclico assim como da fosforilação de proteínas culminando em mudanças na hidrodinâmica e motilidade do espermatozoide (Breitbart e Naor, 1999).

Visto que a grande maioria dos laboratórios utiliza sêmen congelado para o procedimento de FIV, torna-se necessário a adoção de métodos para selecionar os espermatozoides viáveis, com motilidade progressiva e morfologia normal uma vez que eles não são expostos as barreiras de seleção natural como ocorre no ambiente *in vivo* (Sepúlveda *et al.*, 2018). Portanto, a seleção espermática realizada no laboratório tem o intuito de remover espermatozoides mortos (danificados e/ou imóveis), o plasma seminal como também substâncias adicionadas ao sêmen durante a criopreservação (crioprotetores e diluentes) (Zavos, 1992) e, ao mesmo tempo, iniciar a capacitação espermática (Centola *et al.*, 1998). A seleção dos espermatozoides viáveis pode ser realizada empregando o método de *swim-up*, lavado espermático ou pela centrifugação em gradiente de densidade (Percoll) (Karamahmutoglu *et al.*, 2014). Nesse sentido, o gradiente de Percoll se destaca como o método de seleção espermática mais utilizado nos procedimentos de FIV na espécie bovina (Sepúlveda *et al.*, 2018).

O Percoll é constituído por partículas de sílica coloidal recobertas com polivinilpirrolidona (PVP) (Samardzija *et al.*, 2006) e, nesse método, são utilizadas preparações com diferentes concentrações de Percoll para formar um gradiente (Parrish *et al.*, 1995). O sêmen congelado/descongelado é depositado na porção superior do gradiente e submetido à centrifugação, permitindo a separação dos espermatozoides viáveis dos demais componentes como crioprotetores, diluentes, células, detritos e bactérias (Oshio, 1988; Sepúlveda *et al.*, 2018).

Após a seleção dos espermatozoides, o co-cultivo, na placa de fertilização, permitirá a interação oócito-espermatozoide. A ligação do espermatozoide, pela porção apical do acrossoma (Oko e Sutovsky, 2009), à zona pelúcida do oócito promove a reação acrossômica (RA), um evento no qual ocorre a fusão das membranas plasmática e acrossomal externa do espermatozoide (Yanagimachi, 1995), promovendo a liberação de enzimas hidrolíticas e a exposição de domínios que serão necessários para a fertilização (Breitbart e Naor, 1999). Com a RA, os receptores ZP2, localizados na membrana acrossomal interna, ficam expostos e permitem a ligação do espermatozoide à zona pelúcida (Gadella, 2010), favorecendo a união

da membrana plasmática do espermatozoide com a do oócito (Kupker *et al.*, 1998). A partir da interação dessas membranas, ocorre a liberação do cálcio intracelular, presente no oócito, a ativação do mesmo, a exocitose dos grânulos corticais e a retomada da meiose, resultando na liberação do segundo corpúsculo polar e no aparecimento dos pronúcleos materno e paterno (Ducibella, 1996; Kupker *et al.*, 1998).

Portanto, a fim de mimetizar o ambiente de fertilização (a ampola da tuba uterina) e favorecer a penetração do espermatozoide no oócito, o co-cultivo dos gametas deve ser realizado em meio adequado assim como em condições favoráveis (temperatura, umidade, pH). O meio mais comumente empregado nos protocolos de FIV é FERT-TALP (Tyrode-albumina-lactato-piruvato) (Gonçalves *et al.*, 2007). Para melhorar a capacitação e motilidade espermáticas *in vitro* e, conseqüentemente, as taxas de fertilização, esse meio é suplementado com penicilamina, hipotaurina, epinefrina e heparina (Parrish *et al.*, 1988). Geralmente, o co-cultivo dos gametas é realizado em microgotas de 70 µl de meio FIV recobertas por óleo mineral (Botta *et al.*, 2019). A concentração final de espermatozoides vivos adicionados às gotas é de  $2 \times 10^6$ /mL e o período de incubação em estufa varia de 15 a 18 horas em 38,5°C, em 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade (Wang *et al.*, 2007).

### 2.1.3 Cultivo *in vitro*

O cultivo *in vitro* (CIV) corresponde à última etapa da PIVE, onde o zigoto formado é cultivado até atingir o estágio de blastocisto, quando o embrião deve passar por uma série de mudanças. Durante essa etapa ocorre a clivagem, a formação de duas linhagens celulares (trofotoderma e a massa celular interna) (Brinkhof *et al.*, 2017), a ativação do genoma, a compactação e a formação do blastocelo (Watson, 1992; Lonergan *et al.*, 1999; Watson e Barcroft, 2001).

No ambiente *in vivo*, o embrião resultante da fertilização é transportado até o útero enquanto passa por uma série de divisões mitóticas, alcançando o mesmo no estágio de 16-32 células, cerca de 4 a 5 dias após a fertilização (Lonergan *et al.*, 2016; Valadão *et al.*, 2019). Com as sucessivas mitoses, as junções entre os blastômeros tornam-se mais compactas de forma que a massa celular do embrião passa a ocupar grande parte do espaço perivitelino, caracterizando assim o estágio de mórula (5º dia) (Lindner e Raymond, 1983; Lonergan *et al.*, 2016). Mais tarde, essa massa compacta de células passa a ocupar até 70% do espaço perivitelino (mórula compacta) (6º dia) (Lindner e Wright, 1983). Posteriormente, as células do trofotoderma iniciam a produção de fluido em direção ao interior da mórula, formando

uma cavidade preenchida por líquido, a blastocele, originando o blastocisto inicial (Lindner e Wright, 1983; Landim-Alvarenga e Prestes, 2006). Por volta do 7º dia, desenvolve-se um blastocisto que ao longo dos dias alcançará os estádios de blastocisto expandido (8º dia) e eclodido (9º dia), que finalmente deixa a zona pelúcida permitindo assim sua implantação no lúmen uterino (Lindner e Wright, 1983; Lonergan *et al.*, 2016; Pedersen *et al.*, 2017).

Durante as primeiras clivagens, o desenvolvimento embrionário é conferido pelos RNAs e proteínas originados do oócito (Schulz e Harrison, 2019). Ao longo do desenvolvimento do embrião ocorre uma alteração no controle do genoma, marcado pela transição do controle materno para embrionário (Landim-Alvarenga e Prestes, 2006). Em bovinos, a ativação do genoma acontece por volta do estágio de 8-16 células (Barnes e First, 1991; Graf *et al.*, 2014), período no qual o embrião torna-se capaz de formar diversas linhagens celulares (Pedersen *et al.*, 2017). É nesse momento em que ocorre a transcrição materno-embrionária, onde transcritos e proteínas de origem materna são substituídos por proteínas de origem embrionária (Graf *et al.*, 2014) que, por sua vez, irão orientar o desenvolvimento posterior do embrião.

A fim de mimetizar o ambiente tubárico e uterino, o meio mais comumente utilizado para o cultivo *in vitro* de embriões bovinos é o Fluido Sintético de Oviduto ou SOF (Gandhi *et al.*, 2000). Durante o CIV, os embriões são cultivados em incubadora a 38,5°C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e alta umidade em microgotas contendo meio de cultivo (SOF) por um período que pode variar de sete a nove dias, de acordo com a necessidade (Mello *et al.*, 2016).

Ainda nessa etapa da PIVE é realizado o feeding, por volta de 48 e 96 horas após o início do cultivo, que consiste na troca do meio de cultura presente nas gotas. Esse procedimento é realizado com o intuito de fornecer nutrientes necessários durante o desenvolvimento dos embriões, bem como para remover metabólitos tóxicos acumulados durante o cultivo (Takahashi *et al.*, 2000; Hashimoto *et al.*, 2008).

## 2.2 Criopreservação de embriões

O nascimento dos primeiros produtos oriundos de embriões criopreservados (Whittingham, 1971) promoveu um grande avanço no conhecimento científico relacionado à criopreservação e, a partir desse estudo, novas pesquisas foram desenvolvidas. A criopreservação se tornou uma ferramenta de grande utilidade na biologia reprodutiva, possibilitando o armazenamento de gametas e embriões por longos períodos. O objetivo principal da criopreservação é manter o metabolismo celular em estado de quiescência por

períodos prolongados (Whittingham, 1980; Mazur, 1984; Rodrigues, 1992). Isso é possível graças à estocagem do material genético sob temperaturas extremamente baixas (-196°C, em nitrogênio líquido), permitindo, portando, a conservação da função celular por meio da manutenção da integridade das membranas e organelas após o aquecimento, favorecendo o desenvolvimento embrionário subsequente (Vanderzwalment *et al.*, 2020).

Na esfera reprodutiva, a utilização da criopreservação apresenta grande interesse científico e econômico. Adicionalmente, a associação da criopreservação com a PIVE representa uma série de vantagens, visto que a utilização dessas técnicas, em conjunto, possibilita o armazenamento dos embriões excedentes produzidos durante a PIVE, facilita sua comercialização e transporte para locais distantes, permite o planejamento das transferências nas propriedades, favorece a utilização de fêmeas em cio natural e também a criação de bancos de embriões (Sudano *et al.*, 2012; Do *et al.*, 2014).

Com o intuito de permitir o armazenamento dos embriões produzidos por períodos prolongados, foram desenvolvidas as metodologias de criopreservação: congelamento lento (Whittingham, 1971) e vitrificação (Rall e Fahy, 1985). Dentre as técnicas desenvolvidas para criopreservar embriões bovinos produzidos *in vitro*, a vitrificação destaca-se como o método de escolha (Dode *et al.*, 2013), pois apresenta resultados satisfatórios para embriões PIV, sendo pouco onerosa e de rápida execução (Martínez-Rodero *et al.*, 2021). Para que a técnica de criopreservação seja bem compreendida é preciso considerar a importância dos crioprotetores, das etapas envolvidas no processo e das diferenças entre os métodos de criopreservação de embriões, os quais serão descritos a seguir.

### 2.2.1 Crioprotetores

Para alcançar o objetivo principal da criopreservação, que é a manutenção do metabolismo celular em estado de quiescência, é necessário expor as células não apenas a temperaturas extremamente reduzidas como também a crioprotetores. Nesse sentido, os crioprotetores apresentam grande importância, pois auxiliam na desidratação e proteção celular contra os danos durante a criopreservação e no momento do descongelamento. São classificados em intracelulares ou extracelulares de acordo com sua capacidade de penetrar ou não na membrana celular (Pereira e Marques, 2008).

Os crioprotetores intracelulares possuem baixo peso molecular e estrutura semelhante à da água e, por essa razão, atravessam as membranas celulares com facilidade. Ao atravessarem a membrana celular, se ligam as moléculas de água intracelular por meio de pontes de hidrogênio, diminuindo o ponto crioscópico, e impedindo assim a formação de cristais de gelo

no interior das células (Pereira e Marques, 2008; Swain e Smith, 2010). Compõem essa classe de crioprotetores o etilenoglicol, dimetilsulfóxido, glicerol, metanol, etanol e o propilenoglicol (Lima, 2015).

Por outro lado, os crioprotetores extracelulares, que apresentam alto peso molecular, reduzem a formação de cristais de gelo intracelulares e promovem a desidratação devido ao aumento da osmolaridade que promovem no meio extracelular (Swain e Smith, 2010). Quando utilizados, diminuem a concentração de crioprotetores intracelulares necessários para a vitrificação tornando a solução menos tóxica (Pereira e Marques, 2008). Os açúcares são os principais representantes desse grupo e são classificados em: monossacarídeos (glicose, galactose, frutose e manose), dissacarídeos (sacarose e trealose) e polissacarídeos (rafinose) (Swain e Smith, 2010).

## 2.2.2 Metodologias de criopreservação

Atualmente, as duas técnicas de criopreservação mais amplamente empregadas em embriões bovinos são o congelamento lento e a vitrificação (Gómez *et al.*, 2020; Arshad *et al.*, 2021). As principais diferenças entre as duas metodologias baseiam-se no tipo e concentração de crioprotetores usados e na taxa de resfriamento aplicada durante o procedimento (Vajta e Kuwayama, 2006).

No congelamento lento, os embriões são expostos de maneira gradual a baixas concentrações de crioprotetores (Valojerdi *et al.*, 2009; Saragusty e Arav, 2011). Em seguida, as palhetas contendo os embriões são submetidas ao resfriamento e, após o período de equilíbrio, a temperatura é reduzida lentamente. Ao atingir a temperatura desejada (-30°C), as palhetas são imersas em nitrogênio líquido (Vajta e Nagy, 2006; Sanches *et al.*, 2017). Nessa metodologia, a temperatura é reduzida cerca de 0,3 a 0,5°C a cada minuto (Saragusty e Arav, 2011). Para isso, é necessária a utilização de aparelho programável, permitindo assim a redução da temperatura de forma lenta e controlada (Gómez *et al.*, 2020). No entanto, com a utilização de baixas concentrações de crioprotetores, a capacidade de prevenir a formação de cristais de gelo se torna limitada (Pereira e Marques, 2008), podendo resultar em efeitos deletérios sobre a estrutura celular (Pegg, 2005).

Ao contrário do que ocorre no congelamento lento, na vitrificação são utilizadas taxas de resfriamento extremamente altas, juntamente com altas concentrações de crioprotetores (Vajta e Nagy, 2006). Além disso, a vitrificação não depende de maquinário específico para sua realização e consome menor tempo, mas exige grande habilidade do manipulador (Gómez *et al.*, 2020).

### 2.2.3 Vitrificação

Na vitrificação não ocorre a formação de cristais de gelo no interior das células, pois, quando a solução, em estado líquido, é resfriada de forma abrupta em temperaturas superiores a 10.000°C/minuto, em nitrogênio líquido, o congelamento não ocorre e a solução se torna altamente viscosa, passando diretamente para o estado vítreo (Carvalho *et al.*, 2011). A mudança da solução de vitrificação para o estado vítreo é possível devido a associação entre temperaturas extremamente reduzidas e a utilização de altas concentrações de crioprotetores (Vajta e Nagy, 2006). Assim, os crioprotetores utilizados promovem saída rápida de água intracelular e deixam as células embrionárias mais permeáveis a sua entrada. Contudo, maiores concentrações de crioprotetores podem causar prejuízos de origem tóxica ou osmótica aos embriões criopreservados. Por essa razão, realiza-se a combinação de crioprotetores com o intuito de reduzir a toxicidade das soluções de vitrificação.

Novas técnicas de vitrificação foram criadas com o intuito de reduzir o volume da solução, a temperatura utilizada, as perdas durante o processo e, assim maximizar a utilização dos embriões para fins comerciais e de pesquisa (Mezzalana e Vieira, 2006; Carvalho *et al.*, 2011). Nesse sentido, foram desenvolvidas as seguintes técnicas de vitrificação: convencional (Ali e Shelton, 1993); em palhetas fechadas (CPS) (Chen *et al.*, 2001); em palhetas abertas (OPS) (Vajta *et al.*, 1997); em pipetas de desnudamento (Sun *et al.*, 2008); em grades de microscopia eletrônica (Steponkus *et al.*, 1990); *cryoloop* (Lane *et al.*, 1999); em espátula (Tsang e Chow, 2009); em superfície sólida (Dinnyes *et al.*, 2000); e *cryotop* (Hamawaki *et al.*, 1999). Atualmente, a técnica de *cryotop* é amplamente utilizada em laboratórios de reprodução humana e animal para criopreservar oócitos e embriões, pois apresenta bons resultados em relação à sobrevivência embrionária após o aquecimento (Morató *et al.*, 2010; Keshavarzi *et al.*, 2022).

A técnica de *Cryotop* foi desenvolvida com o intuito de realizar o procedimento de vitrificação com maior assepsia (Carvalho *et al.*, 2011). Nessa técnica são empregadas hastes constituídas de polipropileno que, apresentam uma extremidade estreita e afilada, onde os oócitos ou embriões são depositados utilizando um volume mínimo (<0,1 µL) de solução (Kuwayama, 2007; Leme *et al.*, 2016). O *cryotop* conta também com uma tampa plástica que é usada para recobrir a estrutura, protegendo as amostras criopreservadas durante o armazenamento (Lima, 2015). Assim, na vitrificação utilizando o *Cryotop*, os oócitos/embriões são expostos às soluções de equilíbrio e vitrificação contendo crioprotetores, e são

posteriormente transferidos para a extremidade da haste de polipropileno com volume de até 1  $\mu$ L. Em seguida, a haste é imersa em nitrogênio líquido em até 30 segundos após a exposição à solução de vitrificação. Por fim, a tampa plástica é encaixada na haste e o cryotop é armazenado em botijões criogênicos.

Atualmente, a vitrificação é considerada a metodologia mais adequada para criopreservar embriões PIV (Vajta *et al.*, 1998), pois esses embriões apresentam maior sensibilidade à criopreservação em relação aos embriões produzidos *in vivo* (Pollard e Leibo, 1994). A reduzida criotolerância tem sido relacionada ao maior conteúdo de lipídios e a diferença lipídica relacionada às membranas dos mesmos (Abe *et al.*, 2002; Sudano *et al.*, 2012).

Alguns pesquisadores sugerem que o maior conteúdo lipídico nesses embriões possa estar relacionado à suplementação e, conseqüente, absorção do soro fetal bovino do meio de cultivo (Abe *et al.*, 2002) ou em decorrência de alguma anormalidade no metabolismo energético embrionário (Sudano *et al.*, 2012). Em contrapartida, as diferenças na composição da membrana plasmática parecem estar relacionadas com a fluidez, permeabilidade e comportamento da mesma quando submetida a tratamentos térmicos (Sudano *et al.*, 2012). Logo, a vitrificação apresenta-se mais eficiente para criopreservar embriões produzidos *in vitro*, pois, além de ser um método rápido e de baixo custo apresenta melhores resultados quanto à sobrevivência embrionária pós-aquecimento, em comparação ao congelamento lento (Dode *et al.*, 2013; Sanches *et al.*, 2017; Arshad *et al.*, 2021; Najafzadeh *et al.*, 2021).

## 2.3 Estresse oxidativo

### 2.3.1 Espécies reativas de oxigênio

As EROs são subprodutos resultantes do metabolismo celular aeróbico, formadas ao longo as etapas intermediárias da redução do oxigênio (You *et al.*, 2010). Sua síntese ocorre na mitocôndria (Barja, 2007) durante a fosforilação oxidativa (Fujii *et al.*, 2005), mas podem também ser produzidas por outras vias (Deluao *et al.*, 2022). São classificadas em radiculares [radical superóxido ( $O_2^-$ ) e o radical hidroxila ( $OH^\bullet$ ) resultantes da redução de um e três elétrons, respectivamente] e não-radicalares [peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) resultante da redução de dois elétrons] (Guérin *et al.*, 2001; Barreiros *et al.*, 2006).

Essas moléculas apresentam meia-vida curta (Papaharalambus e Griendling, 2007) e são consideradas moléculas instáveis e, portanto, altamente reativas (Andrade *et al.*, 2010), de

modo que para adquirirem elétrons e se tornarem estáveis, acabam por interagir com os constituintes celulares (Deleuse e Goudet, 2010). Dentre as EROs sintetizadas durante o metabolismo celular, o  $\text{OH}^\bullet$  é considerado o radical livre mais reativo, uma vez que participa da oxidação dos ácidos graxos que constituem a membrana celular induzindo a peroxidação lipídica da mesma (Guérin *et al.*, 2001).

A manutenção das EROs em níveis considerados fisiológicos é possível devido à existência do sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático nas células (Soto-Heras e Paramio, 2020). O sistema de defesa enzimático é formado pela superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) e peroxirredoxinas (Prxs) (Halliwell, 2011). A SOD realiza a conversão do radical superóxido em  $\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que pode ser degradado por outras enzimas (Kehrer e Klotz, 2015), enquanto a CAT ou GPx impedem a formação do radical hidroxila por meio da ação sobre o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , reduzindo-o a  $\text{H}_2\text{O}$  (Toyokuni, 1996).

Já o sistema de defesa não enzimático é constituído por vitaminas (A, C e E), glutatona (GSH), hipotaurina, taurina e cisteamina (Guérin *et al.*, 2001). Além de ter função importante no sistema de defesa não-enzimático das células, a GSH também serve de substrato para a síntese de glutatona peroxidase (GPX), que é a principal enzima presente no sistema de defesa enzimático (Guérin *et al.*, 2001). Por outro lado, a cisteamina tem papel fundamental na neutralização do radical hidroxila (Zheng *et al.*, 1988).

### 2.3.2 Papel das EROs no desenvolvimento embrionário

Quando produzidas em níveis fisiológicos, durante o metabolismo celular, as EROs funcionam como moléculas sinalizadoras (Dowling e Simmons, 2009; Mittler *et al.*, 2011), participando de diversos processos celulares relacionados à regulação do crescimento e desenvolvimento (Hancock *et al.*, 2001). Logo, quando os níveis dessas moléculas se tornam reduzidos pode ocorrer retardo ou bloqueio no desenvolvimento embrionário (Guérin *et al.*, 2001). Por outro lado, quando ocorre falha no sistema de defesa celular intrínseco, os níveis de EROs se elevam dentro da célula podendo desencadear o desenvolvimento do estresse oxidativo (Redza-Dutordoir e Averill-Bates, 2016).

O estresse oxidativo é, portanto, caracterizado pelo aumento das concentrações de EROs acima dos valores considerados fisiológicos. Isso ocorre devido a um desequilíbrio que pode ser resultante do aumento nos níveis de substâncias oxidantes ou pela redução de moléculas antioxidantes nas células (Sikka, 2001; Andrade *et al.*, 2010). Assim, as EROs

podem reagir e causar efeitos deletérios sobre constituintes celulares como proteínas, lipídios, carboidratos, ácidos nucleicos e organelas (Halliwell, 2011; Shields *et al.*, 2021) para se tornarem estáveis. Assim, os elevados níveis de EROs podem interferir na função celular por meio de alterações mitocondriais, promovendo o bloqueio do desenvolvimento embrionário ou até mesmo a ativação da cascata de apoptose (Wang *et al.*, 2002; Redza-Dutordoir e Averill-Bates, 2016).

No ambiente *in vivo*, tanto os oócitos quanto os embriões encontram-se protegidos dos efeitos do estresse oxidativo devido à presença de substâncias neutralizadoras de EROs contidas nos fluidos folicular e tubárico (Guérin *et al.*, 2001; Andrade *et al.*, 2010; Ambekar *et al.*, 2013) de modo que a defesa dessas estruturas é realizada tanto por componentes não enzimáticos quanto enzimáticos. Entre os protetores não enzimáticos estão incluídos a glutathiona reduzida (GSH), vitaminas, piruvato, taurina, hipotaurina e cisteamina (Guérin *et al.*, 2001), dentre os quais destaca-se a GSH visto que é considerada por alguns autores a principal defesa não enzimática contra EROs presente nos gametas (Luberda, 2005) e embriões de mamíferos (Takahashi *et al.*, 1993, Gardiner *et al.*, 1998). Esse componente do sistema antioxidante, por sua vez, parece estar relacionado a melhores índices de desenvolvimento embrionário *in vitro* quando presente em altas concentrações (Luvoni *et al.*, 1996; Gardiner *et al.*, 1998).

### 2.3.3 Condições de cultivo *in vitro* e produção de EROs

Conforme mencionado anteriormente, as EROs apresentam grande importância na regulação de funções fisiológicas (Covarrubias *et al.*, 2008) uma vez que participam de diversos eventos relacionados à maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário (Soto-Heras e Paramio, 2020). Contudo, quando presentes em concentrações elevadas podem desencadear a morte celular (Halliwell, 2000) em decorrência do desenvolvimento de estresse oxidativo e danos diretos sobre componentes celulares (Halliwell, 2011).

Quando os oócitos são retirados de seu ambiente original, para serem utilizados na PIVE, perdem sua proteção natural (Wang *et al.*, 2002). Dessa forma, após a remoção dos oócitos do ambiente folicular, substâncias que compõem o sistema antioxidante não enzimático como vitaminas, GSH e piruvato (Guérin *et al.*, 2001) são perdidas. Na produção *in vitro*, tanto oócitos quanto embriões são cultivados em um ambiente não fisiológico, sendo expostos a fatores oxidantes (temperatura, tensão de oxigênio, pH do meio, composição e concentração de componentes nos meios de cultivo, proporção de embriões por gota de

cultivo, luz artificial, produção de EROs por espermatozoides durante a fertilização, criopreservação/aquecimento) que contribuem para a produção excessiva de EROs (Guérin *et al.*, 2001; Bedaiwy *et al.*, 2006; Swain, 2019; Lin e Wang, 2020; Soto-Heras e Paramio, 2020).

No ambiente *in vivo*, durante seu desenvolvimento no interior do trato reprodutivo feminino, o embrião é exposto a concentrações de oxigênio menores do que aquelas geralmente empregadas nos sistemas de cultivo *in vitro* (20%) (Fischer e Bavister, 1993). Nesse sentido, estudo comparando diferentes tensões de oxigênio (20% vs 5%) mostrou que o cultivo de oócitos em baixa tensão de oxigênio resultou em melhor competência de desenvolvimento (Pereira *et al.*, 2010). Além disso, embriões cultivados em baixa tensão de O<sub>2</sub> apresentaram melhor desenvolvimento e maiores taxas de produção de blastocistos enquanto embriões cultivados em 20% apresentaram maiores níveis de EROs e maior abundância de transcritos relacionados ao estresse oxidativo (Leite *et al.*, 2018).

Durante a PIVE, oócitos e embriões são manipulados estando, portanto, sujeitos à mudanças de temperatura, alterações de pH do meio onde estão inseridos e, também sendo expostos à luz artificial. Juntamente com a temperatura, a manutenção do pH do meio é fundamental para o bom funcionamento das enzimas que compõem o sistema de defesa antioxidante (Deluao *et al.*, 2022). Nesse contexto, Amaral e colaboradores (2020) demonstraram que a exposição de oócitos e zigotos bovinos ao estresse térmico pelo calor (40,5°C), durante o cultivo *in vitro*, resultou no desenvolvimento de estresse oxidativo, além de interferir negativamente na produção de interferon-tau e no desenvolvimento embrionário subsequente. Adicionalmente, foi demonstrado que a exposição de embriões à luz fluorescente interferiu diretamente em sua capacidade de desenvolvimento após a transferência (Takenaka *et al.*, 2007). Assim, no ambiente *in vitro*, embriões resultantes da PIVE precisam contar com seus próprios mecanismos de defesa para se protegerem dos efeitos do estresse oxidativo (Guérin, 2001). Dessa forma, concentrações elevadas de EROs durante a MIV e FIV dos oócitos podem causar diversos efeitos deletérios e, com isso, prejudicar a maturação nuclear, induzir a apoptose e interferir na fertilização (Soto-Heras e Paramio, 2020).

Em relação à criopreservação, já foi demonstrado que tanto o congelamento quanto o descongelamento induzem a produção de EROs, gerando estresse oxidativo em embriões (López-Damián *et al.*, 2020). Isso ocorre porque durante a criopreservação as células passam por um período de hipóxia, reduzindo a produção de ATP (Hochachka, 1986) e, no momento do aquecimento, as concentrações de O<sub>2</sub> aumentam rapidamente e induzem a formação do radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), que é degradado em peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e no radical

hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ) (López-Damián *et al.*, 2020). Visto que os níveis excessivos de EROs podem prejudicar a viabilidade celular de diversas formas, pesquisas têm sido desenvolvidas com substâncias antioxidantes durante a PIVE para tentar minimizar os efeitos do estresse oxidativo como a peroxidação lipídica (López-Damián *et al.*, 2020), danos ao DNA (Takahashi *et al.*, 2000) e às mitocôndrias (Dalcin *et al.*, 2013; Hara *et al.*, 2018).

## 2.4 Antioxidantes

Os antioxidantes são moléculas de origem natural ou sintética (Neha *et al.*, 2019) que inibem ou retardam a oxidação de outras moléculas (Rozoy *et al.*, 2012), por meio da sua ligação aos radicais livres (Zarbakhsh, 2021), de modo a proteger a estrutura celular e/ou reparar os danos celulares ocasionados por essas moléculas (Tebboub e Kechrid, 2019). Uma vez que os meios de cultivo utilizados na PIVE não dispõem de quantidade suficiente de substâncias antioxidantes, sua suplementação com essas moléculas se tornou de grande interesse (Deluao *et al.*, 2022) sendo estas, portanto, comumente adicionadas aos meios de cultivo embrionário para impedir e/ou reduzir a ocorrência de danos relacionados ao estresse oxidativo nos embriões (Goto *et al.*, 1993; Budani e Tiboni, 2020).

Nesse sentido, compostos tiol com baixo peso molecular como o beta-mercaptoetanol, cisteína, cistina e cisteamina têm sido utilizados nos meios de cultivo embrionário (Hosseini *et al.*, 2009; De Mattos *et al.*, 2022) por serem precursores para a síntese de glutathione, que é a principal defesa antioxidante não enzimática presente nos embriões (Gardiner *et al.*, 1998).

De Matos e Furnus (2000) demonstraram que a suplementação do meio de maturação com beta-mercaptoetanol contribuiu para o aumento na síntese de glutathione, melhorando a produção de embriões a partir de oócitos maturados *in vitro*. Já em embriões, foi demonstrado que a suplementação do meio de cultivo com esse antioxidante promoveu aumento na taxa de blastocistos, mesmo quando os embriões foram cultivados em uma alta tensão de  $\text{O}_2$  (20%) (Takahashi *et al.*, 2002). Adicionalmente, sua adição ao meio de cultivo pós-descongelamento proporcionou aumento na sobrevivência dos blastocistos, nas taxas de eclosão e no número total de células nos embriões tratados (Nedambale *et al.*, 2006).

Portanto, a suplementação do meio de maturação ou cultivo embrionário com beta-mercaptoetanol se mostra benéfica visto que aumenta os níveis de glutathione intracelular (Abeydeera *et al.*, 1998), contribui para o aumento no número de blastocistos produzidos em condições de estresse (Takahashi *et al.*, 2002), melhora os índices de sobrevivência embrionária pós-criopreservação (De Mattos *et al.*, 2022), as taxas de eclosão (Nedambale *et al.*, 2006)

como também melhora a qualidade embrionária (Caamaño *et al.*, 1998).

Na presente dissertação foram estudados fatores relacionados ao estresse oxidativo durante a criopreservação de embriões PIVE, bem como os efeitos da suplementação com beta-mercaptoetanol (BME) no meio de cultivo pós-aquecimento.

### 3 HIPÓTESES

3.1 Experimento I: A vitrificação e o aquecimento elevam as concentrações de espécies reativas de oxigênio em embriões produzidos *in vitro* criopreservados

A vitrificação e o aquecimento promovem aumento nas concentrações de espécies reativas de oxigênio e induzem o desenvolvimento de estresse oxidativo em embriões vitrificados quando comparados aos blastocistos frescos.

3.2 Experimento II: Efeitos da atenuação do estresse oxidativo sobre a sobrevivência e qualidade de embriões produzidos *in vitro* e vitrificados

A atenuação do estresse oxidativo, por meio da utilização do antioxidante beta-mercaptoetanol, melhora a sobrevivência e a qualidade de embriões vitrificados.

### 4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar o papel da vitrificação e aquecimento na geração de espécies reativas de oxigênio em embriões produzidos *in vitro* criopreservados, bem como avaliar a qualidade embrionária após o aquecimento e cultivo de embriões vitrificados na presença de beta-mercaptoetanol.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar as concentrações de espécies reativas de oxigênio em blastocistos frescos e vitrificados;
- Comparar as taxas de reexpansão de embriões vitrificados cultivados em meio contendo ou não antioxidante;
- Determinar as taxas de eclosão e índice oxidativo de blastocistos frescos e vitrificados após 48 horas de cultivo na presença ou ausência de beta-mercaptoetanol;

- Avaliar a qualidade de embriões vitrificados cultivados na presença de beta-mercaptoetanol;

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Local do experimento e obtenção de gametas

Os estudos I e II foram realizados no período de julho a outubro de 2021, no Laboratório de Reprodução Animal, da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora/MG).

Para a produção dos embriões foram utilizados oócitos recuperados de ovários adquiridos de abatedouro local (com Serviço de Inspeção Federal) e palhetas de sêmen congelado (oriundas de central de comercialização).

### 5.2 Delineamento experimental

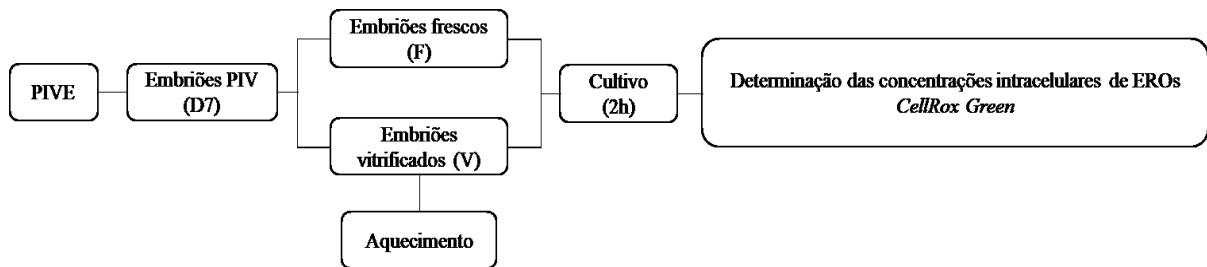
#### Experimento I

No experimento I, investigamos se a vitrificação e o aquecimento poderiam promover o aumento das concentrações de EROs em embriões criopreservados. Para isso, os embriões frescos (D7), oriundos de produção *in vitro*, foram avaliados e selecionados de acordo com sua qualidade para o experimento. Foram selecionados blastocistos e blastocistos expandidos de grau 1. Após a seleção, os embriões foram segregados de forma aleatória em dois grupos experimentais: fresco (F) e vitrificado (V).

Os embriões frescos foram utilizados como controle e, logo após a seleção, foram transferidos para uma placa de cultivo (contendo gotas de meio SOF) que foi acondicionada em estufa incubadora. Os embriões remanescentes foram criopreservados por meio de vitrificação e submetidos ao aquecimento logo depois. Em seguida, os embriões vitrificados aquecidos foram lavados e transferidos para a mesma placa de cultivo, onde foram cultivados por 2 h juntamente com os embriões frescos sob as condições de cultivo descritas a seguir.

Após 1 h do início do cultivo, foi adicionada às gotas, contendo os embriões, a sonda fluorogênica CellRox Green. Os embriões foram corados durante 1 h e após esse período foram lavados, montados em lâminas de microscopia e fotografados individualmente com

microscópio de fluorescência. Posteriormente, as imagens de cada embrião foram avaliadas no *Software ImageJ* para mensuração e comparação das EROs intracelulares presentes nos embriões de cada grupo.



**Figura 1:** Representação esquemática do delineamento do experimento I.

## Experimento II:

Baseado no achado do experimento I, delineamos o experimento II. Nesse experimento, investigamos se a utilização do antioxidante beta-mercaptoetanol (BME) poderia atenuar o estresse oxidativo promovido pela vitrificação e aquecimento e, melhorar a sobrevivência e a qualidade embrionárias após a criopreservação. Os embriões frescos (F) e vitrificados aquecidos (V) foram selecionados, vitrificados e aquecidos como no experimento I. Os embriões frescos e vitrificados aquecidos foram cultivados em gotas de meio SOF suplementadas (+) ou não (-) com 100  $\mu$ M BME formando quatro grupos experimentais: F- (fresco cultivado sem antioxidante), F+ (fresco cultivado com antioxidante), V- (vitrificado cultivado sem antioxidante) e V+ (vitrificado cultivado com antioxidante).

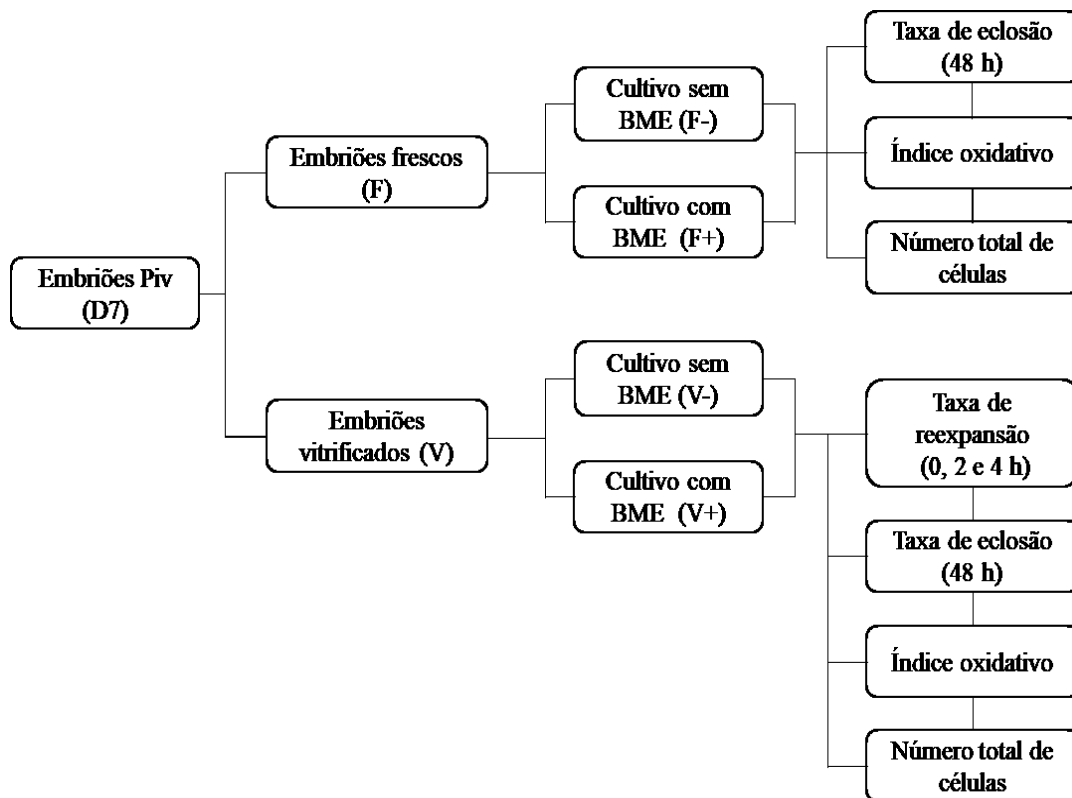
Inicialmente, os embriões vitrificados aquecidos foram transferidos para placas de cultivo com e sem BME, onde permaneceram por um período de 2 h (tempo médio necessário para sua reexpansão). Após 2 h, foram transferidos também para as placas os embriões frescos (D7), oriundos da replicata da semana. Assim, as placas contendo os embriões frescos (F- e F+) e vitrificados aquecidos (V- e V+) foram acondicionadas em estufa incubadora e os embriões foram cultivados durante 48 h sob as condições de cultivo descritas a seguir.

Durante as primeiras 4 h de cultivo, os embriões vitrificados aquecidos (V- e V+) foram avaliados quanto à reexpansão em 0, 2 e 4 h após o aquecimento. Aproximadamente 1 h antes do fim do cultivo, os embriões oriundos de cada grupo experimental foram corados com CellRox Green e Hoechst 33342. Em seguida, foram lavados e fotografados individualmente,

para serem avaliados, posteriormente, quanto ao índice oxidativo, número total de células e taxa de eclosão. As imagens dos embriões foram avaliadas no *Software ImageJ*.

Ambos experimentos (I e II) foram realizados em duas replicatas. No mínimo, 50 blastocistos de cada grupo foram analisados para coloração, avaliação da reexpansão, eclosão e índice oxidativo

**Figura 2:** Representação esquemática do delineamento do experimento II.



### 5.3 Meios de cultivo e reagentes

Os meios de cultivo e produtos químicos utilizados nos experimentos foram obtidos da Bioklone Reprodução Animal (Jaboticabal, São Paulo, Brasil) e Sigma-Aldrich (Merck, Darmstadt, Germany), exceto quando especificado de outra forma.

### 5.4 Condições experimentais

As etapas de maturação, fertilização, cultivo *in vitro* e cultivo pós-aquecimento foram realizadas em estufa incubadora a 38,5°C, a 5% de CO<sub>2</sub> em ar atmosférico e alta umidade.

### 5.5 Coleta de oócitos e maturação *in vitro*

Ovários de fêmeas bovinas foram coletados de abatedouro local e transportados até o laboratório em solução fisiológica aquecida (37°C). Os complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) foram recuperados através de aspiração folicular e apenas CCOs apresentando citoplasma homogêneo com duas ou mais camadas de células do cumulus foram utilizados nos experimentos. Para a MIV desses CCOs, o TCM 199 foi suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1 µg/mL FSH (Folltropin™, Bioniche Animal Health, Belleville, Canadá), 50 µg/mL de hCG (Chorulon™, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil), 1 µg/mL de 17β estradiol, 16 µg/mL piruvato de sódio, 10.000 UI de penicilina e 10 mg de estreptomicina/mL. Os CCOs foram maturados em grupos de 25, durante 24 h, em gotas de 100 µL de meio MIV recobertas com óleo mineral.

### 5.6 Fertilização e cultivo *in vitro*

Após a MIV, os oócitos maturados foram lavados e transferidos em grupos de 20 para placas contendo gotas de 100 µL de meio FERT TALP (suplementado com 0,6% de BSA, 10 µg/mL de heparina, 18 µM de penicilamina, 10 µM de hipotaurina e 1,8 µM de epinefrina) recobertas por óleo mineral. Para a FIV, foram utilizadas palhetas congeladas de sêmen de touro previamente testado. O sêmen foi descongelado a 36,5°C por 30 segundos e os espermatozoides foram selecionados por centrifugação (7 min em 3600g) em um gradiente descontínuo de Percoll (45/90). Após a remoção do sobrenadante, o *pellet* foi reconstituído em 700 µL de meio TCM-199 tamponado com Hepes e centrifugado novamente (5 min em 520g). O *pellet* foi diluído em meio FERT TALP até a concentração de  $2 \times 10^6$  espermatozoides/mL, e adicionado às gotas de fertilização. A FIV foi realizada durante 18 h. Logo após a FIV, os prováveis zigotos foram desnudados, lavados e transferidos em grupos de 20 estruturas para gotas de fluido sintético de oviduto (SOF-AA) suplementado com 1,5% de SFB e 6 mg/mL de meio de BSA. O cultivo *in vitro* foi realizado durante 7 dias e o *feeding* no D3 e D6.

### 5.7 Vitriificação e aquecimento de embriões

No sétimo dia de cultivo, os blastocistos e blastocistos expandidos de grau 1 foram selecionados, lavados em solução base (TCM 199 suplementado com Hepes, 10% de SFB,

16 µg/mL de piruvato de sódio, 10.000 UI de penicilina e 10 mg de estreptomicina/mL) e vitrificados (5 por haste). Para a vitrificação foi utilizada a técnica de Cryotop. Inicialmente, os embriões foram transferidos para a solução de equilíbrio (solução base suplementada com 10% de SFB, 7,5% de etilenoglicol e 7,5% de DMSO) por 3 minutos. Em seguida, foram transferidos para a solução de vitrificação (solução base suplementada com 10% SFB, 16% de etilenoglicol, 16% de DMSO e 0,5 M de sacarose) e uma gota de 1 µL, contendo os embriões, foi colocada na extremidade da haste de vitrificação (WTA, Cravinhos, Brasil) que foi imersa em nitrogênio líquido em até 30 segundos. Após a vitrificação, as hastes, contendo os embriões, foram mantidas em nitrogênio líquido. Para o aquecimento dos embriões foi utilizada a metodologia descrita anteriormente (Oliveira *et al.*, 2020). A extremidade da haste de vitrificação foi inserida diretamente na solução base suplementada com 1% de SFB e 0,15M de sacarose, onde os embriões permaneceram por 6 minutos. Posteriormente, foram lavados três vezes em tampão fosfato salino (PBS) suplementado com 1% de SFB e, em seguida, em meio SOF.

## 5.8 Cultivo pós-aquecimento

No experimento I, tanto os embriões frescos quanto os vitrificados aquecidos foram transferidos e cultivados na mesma placa de cultivo. A placa continha gotas de 100 µL de meio SOF-AA e foi delimitada ao meio (lado direito e esquerdo). Assim, os embriões de cada grupo foram mantidos sob as mesmas condições ambientais durante todo período de cultivo. Os embriões foram transferidos para as gotas de SOF em grupos de 15 a 20 estruturas. O cultivo pós-aquecimento foi realizado durante 2 h e, após 1 h do início do mesmo, foi adicionada às gotas de meio a sonda fluorogênica CellRox Green.

No experimento II, embriões frescos e vitrificados aquecidos foram cultivados na presença de 100 µM de BME (Gibco BRL, Grand Island, NY). Embriões frescos e vitrificados aquecidos foram transferidos para placas contendo gotas de meio SOF-AA suplementada (+) ou não (-) com 100 µM desse antioxidante, formando assim quatro grupos experimentais: F- (fresco cultivado sem antioxidante), F+ (fresco cultivado com antioxidante), V- (vitrificado cultivado sem antioxidante) e V+ (vitrificado cultivado com antioxidante). A concentração de BME empregada no estudo baseou-se em estudo anterior, que demonstrou que embriões vitrificados aquecidos cultivados na presença desse antioxidante apresentaram maiores taxas de sobrevivência e maior número total de células (Nedambale *et al.*, 2006).

Inicialmente, os embriões vitrificados aquecidos foram transferidos para as placas com

e sem antioxidante logo após seu aquecimento, onde permaneceram durante 2 h. Esses embriões foram avaliados quanto à reexpansão da blastocela em 0, 2 e 4 h após o aquecimento. Após 2h de cultivo, os embriões frescos foram transferidos para as placas com e sem BME. O cultivo dos embriões frescos e vitrificados aquecidos foi realizado durante 48 h. No fim do cultivo, os embriões oriundos dos quatro grupos experimentais foram corados, lavados e fotografados individualmente para serem analisados posteriormente quanto a eclosão, índice oxidativo e número total de células.

### 5.9 Concentração de espécies reativas de oxigênio

Para determinar as concentrações de EROs, blastocistos frescos e vitrificados aquecidos foram incubados com a sonda fluorogênica CellRox Green (Invitrogen Molecular Probes, USA), que exibe fluorescência verde brilhante quando oxidada pelas EROs. Os embriões foram corados, ainda nas gotas, com CellRox Green (1:100), protegidos da luz, em meio SOF-AA a 38.5°C por 1 h. Após a coloração, os embriões foram lavados em TCM 199 e fotografados individualmente utilizando microscópio de fluorescência (EVOS M5000, Thermo Fisher Scientific, EUA) com 361 nm e emissão 497 nm. As imagens digitais de cada embrião foram analisadas com o software *ImageJ* v.1.53 (National Institutes of Health, Maryland, EUA). A intensidade de fluorescência foi calculada através da intensidade média de pixels após a seleção manual da área de cada embrião.

### 5.10 Número total de células

Para a determinação do número total de células, os embriões foram fixados em paraformaldeído 4% e corados Hoechst 33342 (10 µg/mL) por 40 minutos na ausência de luz. Após o período de incubação, os embriões foram lavados em PBS suplementado com 1% de SFB e fotografados individualmente com microscópio de fluorescência (EVOS M5000, Thermo Fisher Scientific, EUA) sob luz ultravioleta com excitação 361 nm e emissão 497 nm. O *Software ImageJ* v.1.53. foi utilizado para determinar o número total de núcleos em cada embrião.

### 5.11 Índice oxidativo

As imagens de cada blastocisto foram analisadas no *Software ImageJ* para mensuração das concentrações intracelulares de EROs (média de pixels) e do número total de células. O

índice oxidativo foi calculado como o produto da divisão entre a concentração total de espécies reativas de oxigênio e número total de blastômeros (Assis *et al.*,2015).

### 5.12 Análise estatística

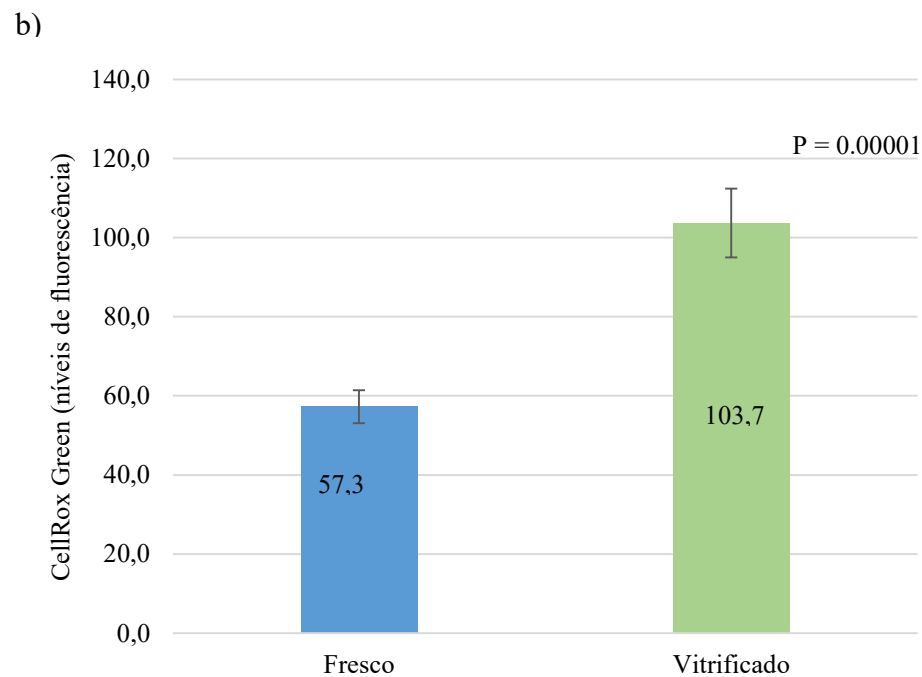
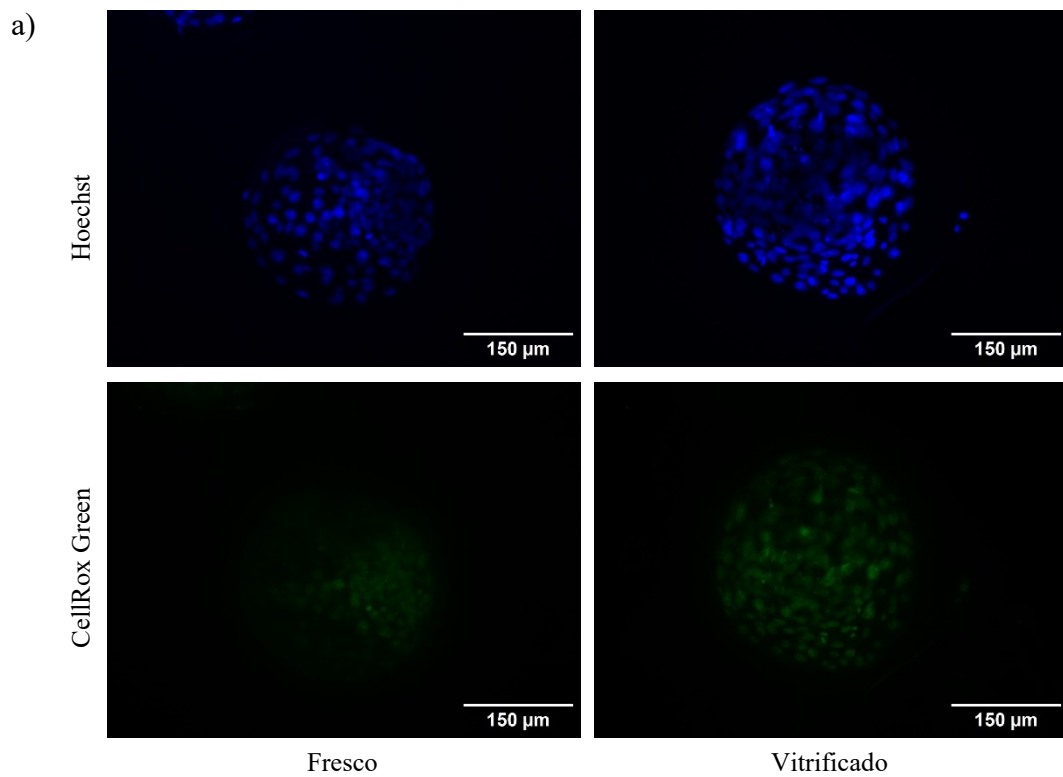
No experimento I, a comparação das concentrações de EROs presentes em embriões frescos e vitrificados foi realizada utilizando o Teste T de Student. No experimento II, as médias entre os grupos para avaliação da taxa de reexpansão e eclosão foram comparadas usando o Teste Exato de Fisher e representadas como um valor percentual. O número total de células entre os grupos experimentais foi comparado utilizando ANOVA. O índice oxidativo dos embriões foi analisado com Kruskal-Wallis e Pós Teste de Dunn.

Os dados obtidos com experimentos I e II foram avaliados utilizando duas replicatas. O nível de significância utilizado foi de 5%. As análises foram realizadas com o auxílio de GraphPad QuickCalcs e Minitab.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Experimento I: A vitrificação e o aquecimento elevam as concentrações de espécies reativas de oxigênio em embriões produzidos *in vitro* criopreservados

No experimento I, foram utilizados 742 oócitos. As taxas de clivagem, blastocistos/oócitos e blastocistos/clivados foram de 71%, 24% e 33%, respectivamente. Foram utilizados no experimento 117 embriões de grau 1, sendo 53 blastocistos frescos e 64 vitrificados aquecidos. A concentração de espécies reativas de oxigênio, representada pelo número médio de pixels, foi significativamente maior ( $P = 0.00001$ ) nos embriões submetidos à vitrificação ( $103,7 \pm 8,7$  média de pixels) quando comparados aos embriões do grupo controle ( $57,3 \pm 4,2$  média de pixels), demonstrando que a vitrificação e o aquecimento promoveram aumento na produção de EROs (Figura 3), nas condições do presente estudo.

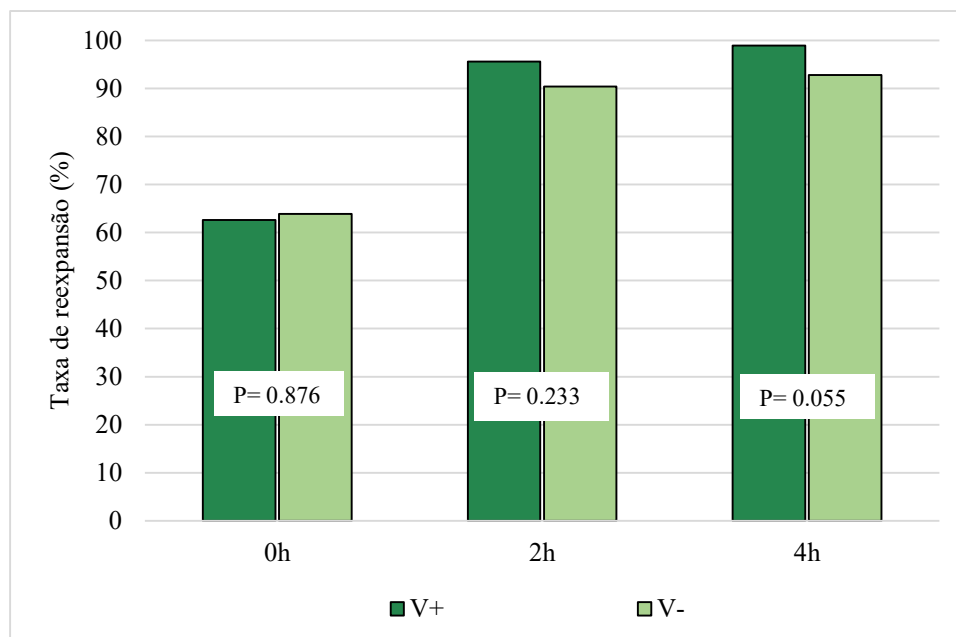


**Figura 3. Efeito da vitrificação e aquecimento na produção intracelular de espécies reativas de oxigênio em embriões criopreservados:** a) Imagem de blastocistos expandidos frescos e vitrificados corados com Hoechst 33342 (fluorescência azul) e CellRox Green (fluorescência verde) fotografados em microscópio de fluorescência e avaliados no *Software ImageJ* e b) Concentrações de espécies reativas de oxigênio presentes em embriões frescos e vitrificados aquecidos. As barras do gráfico correspondem as médias e as barras de erros ao erro padrão da média de cada grupo experimental. A presença do (\*) indica diferença estatística ( $P < 0,05$ ).

## 6.2 Experimento II: Efeitos da atenuação do estresse oxidativo sobre a sobrevivência e qualidade de embriões vitrificados

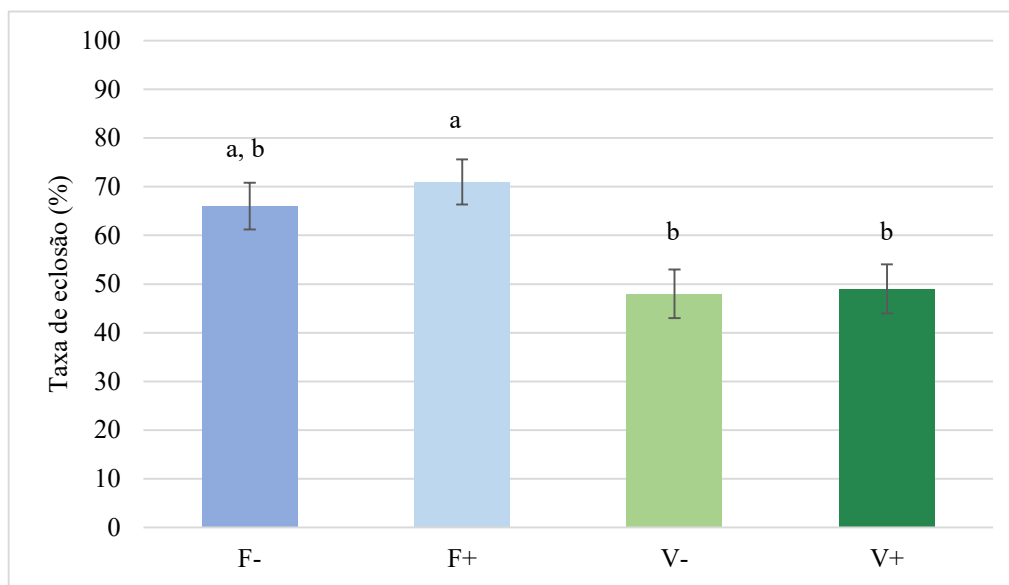
No experimento II, foram realizadas cinco replicatas para a produção e estocagem dos embriões vitrificados. Para a produção dos embriões foram utilizados 1.854 oócitos. As taxas de clivagem, blastocistos/oócitos e blastocistos/clivados foram de 67%, 30% e 44%, respectivamente. Foram vitrificados 363 blastocistos expandidos. Os embriões frescos utilizados nesse experimento foram obtidos em duas replicatas.

A taxa de reexpansão dos embriões vitrificados aquecidos (n=174) cultivados na presença (V+; n=83) e ausência (V-; n=91) de BME foi avaliada em 0, 2 e 4 h após o aquecimento. No entanto, nenhuma diferença foi verificada entre os grupos e momentos avaliados (Figura 4): 0h (V+: 63,9% vs V-: 62,6%; P=0,8764), 2h (V+: 90,4% vs V- : 95,6%; P=0,2338) e 4h (V+: 92,8% vs V-: 98,9%; P=0,0550).



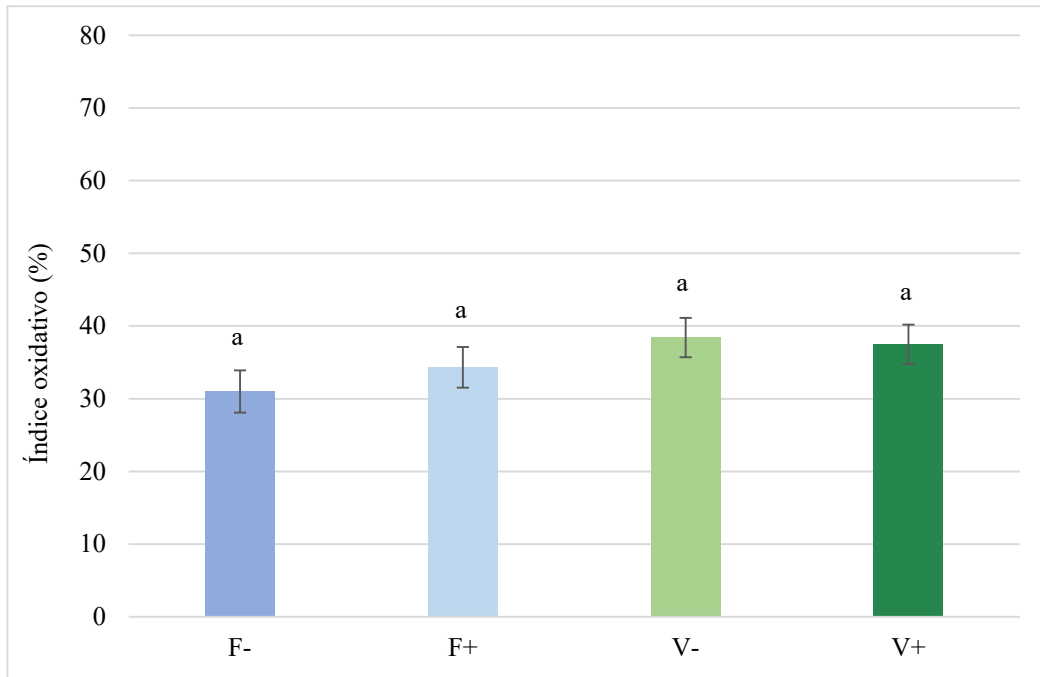
**Figura 4. Representação da taxa de reexpansão de embriões vitrificados cultivados com (V+) e sem (V-) beta-mercaptopetanol após o aquecimento:** os embriões vitrificados aquecidos foram avaliados quanto à taxa de reexpansão em 0, 2 e 4 h após o aquecimento. Para a avaliação da taxa de reexpansão foram utilizados 174 embriões (83 blastocistos vitrificados aquecidos cultivados na presença de beta-mercaptopetanol e 91 blastocistos vitrificados aquecidos cultivados na ausência desse antioxidante). As barras do gráfico correspondem as médias e as barras de erros ao erro padrão da média de cada grupo experimental.

A taxa de eclosão, avaliada no fim do período de cultivo dos embriões ( $n=229$ ), não diferiu entre os grupos V+ (49,4%;  $n=79$ ), V- (48,1%;  $n=81$ ) e F- (65,7%;  $n=35$ ) ( $P>0,05$ ). Entretanto, no grupo F+ (70,6%,  $n=34$ ) foi observado que os embriões apresentavam maior taxa de eclosão quando comparado aos embriões vitrificados (V+ e V-). Portanto, foi possível observar que os embriões vitrificados apresentaram taxa de eclosão semelhante àquela observada nos embriões frescos cultivados sem BME (V+ = 49,4%; V- = 48,1%; F- = 65,7%; F+ = 70,6%) (Figura 5).



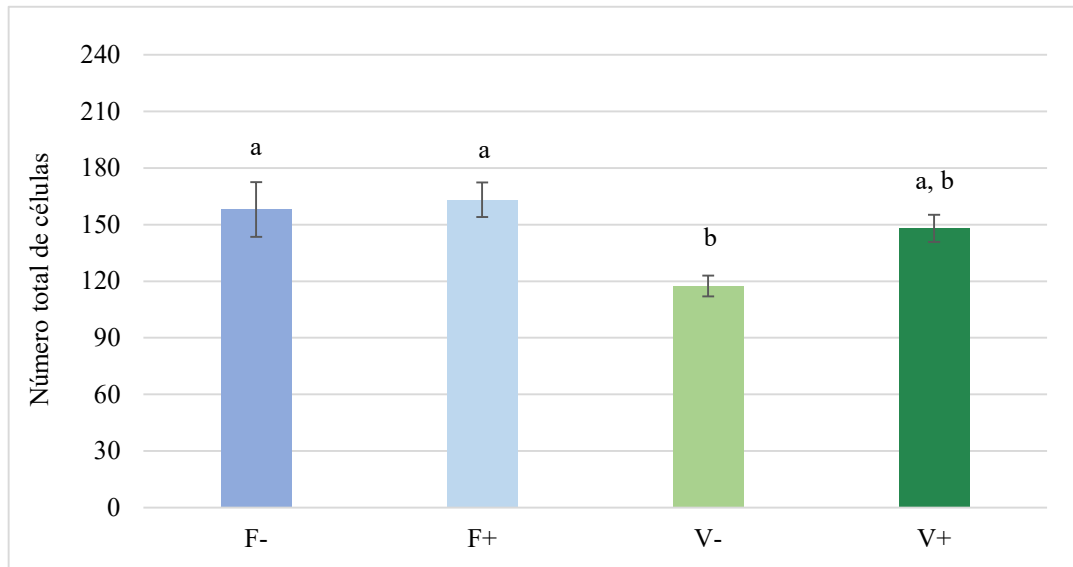
**Figura 5. Taxa de eclosão de embriões frescos e vitrificados submetidos ao cultivo pós-aquecimento:** taxa de eclosão de embriões frescos (F) e vitrificados (V) cultivados na presença (+) e ausência (-) de beta-mercaptoetanol avaliada 48 h após o início do cultivo. Para a avaliação da eclosão foram utilizados 229 embriões (F- = 35; F+ = 34; V- = 81 e V+ = 79). As barras do gráfico correspondem às médias e as barras de erros ao erro padrão da média de cada grupo experimental. Letras diferentes no mesmo gráfico representam diferença estatística ( $P < 0,05$ ).

O índice oxidativo de cada blastocisto foi calculado como o produto da divisão entre a concentração total de espécies reativas de oxigênio e número total de blastômeros (Assis *et al.*, 2015), mas não diferiu entre os grupos analisados (F-:  $31,0 \pm 2,9$ ,  $n=22$ ; F+:  $34,3 \pm 2,8$ ,  $n=32$ ; V-:  $38,4 \pm 2,7$ ,  $n=67$ ; V+:  $37,5 \pm 2,7$ ,  $n=75$ ;  $P= 0,66975$ ) (Figura 6).



**Figura 6. Índice oxidativo de blastocistos frescos e vitrificados:** representação do índice oxidativo dos embriões frescos e vitrificados cultivados na presença (+) e ausência (-) de beta-mercaptoetanol após 48 h de cultivo. Para a avaliação do índice oxidativo foram utilizados 196 embriões (F- = 22; F+ = 32; V- = 67 e V+ = 75). Letras iguais no mesmo gráfico não representam diferença estatística ( $P > 0,05$ ). As barras do gráfico correspondem as médias e as barras de erros ao erro padrão da média de cada grupo experimental.

Por outro lado, o número total de células (Figura 7) presentes nos embriões vitrificados aquecidos cultivados sem BME (V-:  $117,4 \pm 5,5$ ;  $n=81$ ) foi inferior ( $P < 0,05$ ) aos demais grupos experimentais. O número total de células presentes nos embriões vitrificados aquecidos cultivados com BME (V+:  $148,0 \pm 7,3$ ;  $n=78$ ) foi similar ( $P > 0,05$ ) àquele observado em embriões frescos cultivados com (F+:  $163,2 \pm 9,2$ ;  $n=32$ ) e sem BME (F-:  $158,0 \pm 14,5$ ;  $n=23$ ).



**Figura 7. Número total de células de blastocistos frescos e vitrificados:** avaliação da qualidade de embriões frescos e vitrificados cultivados na presença e ausência de beta-mercaptoetanol após 48 horas. Para a avaliação do número total de células foram utilizados 214 embriões (F- = 23; F+ = 32; V- = 81 e V+ = 78). Letras diferentes no mesmo gráfico representam diferença estatística ( $P < 0,05$ ). As barras do gráfico correspondem as médias e as barras de erros ao erro padrão da média de cada grupo experimental.

## 7 DISCUSSÃO

No presente estudo, buscou-se estudar a relação entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a sobrevivência embrionária pós-vitrificação. Para isso, inicialmente, comparamos as concentrações intracelulares de EROs em embriões frescos e vitrificados aquecidos. Posteriormente, aplicamos no meio de cultivo pós-aquecimento o antioxidante beta-mercaptoetanol (BME) com o intuito de combater esses radicais livres e verificamos se o mesmo poderia promover melhorias na viabilidade e qualidade de embriões produzidos *in vitro* submetidos à vitrificação.

Investigando a influência da vitrificação e aquecimento na geração de espécies reativas de oxigênio, em embriões frescos e vitrificados aquecidos corados com *CellRox Green* (experimento I), foi demonstrado que a vitrificação e aquecimento promovem aumento na produção de EROs, o que pode induzir e/ou favorecer maior desenvolvimento de estresse oxidativo nos embriões vitrificados.

Durante a utilização de tecnologias de reprodução assistida, tanto oócitos quanto embriões são inseridos em um ambiente que carece de substâncias antioxidantes para sua proteção (Nasr-Esfahani e Johnson, 1992; Jamil *et al.*, 2020). Por essa razão, apresentam-se mais sensíveis aos efeitos do estresse oxidativo (Hardy *et al.*, 2021). Dessa forma, sua exposição a fatores pró-oxidantes, contidos no ambiente *in vitro*, contribui para maior síntese de EROs, comprometendo assim seu desenvolvimento subsequente (Soto-Heras e Paramio, 2020; Agarwal *et al.*, 2022).

Ainda que a vitrificação apresente vantagens em comparação ao congelamento lento, estudos anteriores relataram que, independente da metodologia adotada, tanto a criopreservação de oócitos bovinos por vitrificação (Zhao *et al.*, 2016) quanto a de embriões da mesma espécie pelo congelamento lento (López-Damián *et al.*, 2020), assim como o descongelamento de espermatozoides bovinos (Chatterjee e Gagnon, 2001) e o aquecimento de blastocistos suínos (Nohalez *et al.*, 2018), promoveram o aumento das concentrações de EROs (Gutnisky *et al.*, 2020) e, reduziram as concentrações intracelulares de GSH (Nohalez *et al.*, 2018), favorecendo o desenvolvimento de estresse oxidativo. Além disso, aumentos similares nas concentrações de EROs foram também observados em blastocistos vitrificados de bovinos oriundos de fertilização *in vitro* (Zhao *et al.*, 2012) e de embriões murinos (Martino *et al.*, 2013).

Embora o resultado do presente estudo esteja de acordo com aquele encontrado por Zhao *et al.* (2012), as concentrações de EROs encontradas foram superiores às aquelas encontradas no referido estudo ( $72,1 \pm 4,3$  vs  $103,7 \pm 8,7$ ). Essa diferença, por sua vez, pode estar relacionada às metodologias diferentes empregadas para a mensuração das concentrações de EROs (H2DCFDA vs CellRox Green) e criopreservação dos embriões por vitrificação (OPS), diferente daquela empregada no presente estudo (Cryotop). Da mesma forma, no presente estudo, as concentrações de EROs presentes em embriões vitrificados aquecidos foram significativamente superiores àquela observada em embriões frescos, corroborando esse estudo anterior. Uma possibilidade descrita na literatura é que o aumento na geração de EROs seja decorrente da disfunção mitocondrial promovida pela vitrificação (Dalcin *et al.*, 2013; Hara *et al.*, 2018), que tem sido associada ao desequilíbrio entre a produção e remoção de EROs (Lin e Beal, 2006). Além disso, elevadas concentrações de EROs, resultantes dos procedimentos de criopreservação, podem atuar nos lipídios que compõem as membranas celulares, desencadeando a peroxidação lipídica (Maia *et al.*, 2010; Yin *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2017).

Apesar da vitrificação ser considerada a alternativa mais interessante para a criopreservação de embriões PIV, blastocistos vitrificados aquecidos ainda apresentam menores taxas de sobrevivência quando comparados aos seus correspondentes frescos (Martínez-Rodero *et al.*, 2021). Nesse contexto, no experimento II do presente estudo, utilizou-se o BME com o intuito de atenuar o estresse oxidativo promovido pela vitrificação e aquecimento.

Para se protegerem dos danos oriundos do estresse oxidativo, os embriões apresentam um sistema de defesa antioxidante. A GSH caracteriza-se como a principal linha de defesa não enzimática presente em oócitos e embriões (Johnson e Nars-Esfahani, 1994), apresentando papel fundamental na proteção celular contra danos oxidativos (Takahashi *et al.*, 2002). Entretanto, no decorrer do desenvolvimento embrionário, a GSH sintetizada durante a maturação reduz até atingir sua menor concentração no estágio de blastocisto (Gardiner e Reed, 1995; Lubberda, 2005). Com o intuito de aumentar a defesa de oócitos e embriões no ambiente *in vitro*, compostos tióis de baixo peso molecular, como o beta-mercaptoetanol, têm sido empregados durante a maturação (Patel *et al.*, 2015) e cultivo embrionário (De Mattos *et al.*, 2022), em função da sua capacidade de neutralizar as EROs por meio da indução da síntese de GSH intracelular (Lubberda, 2005), que ocorre pela redução da cistina a cisteína (Issels *et al.*, 1988).

Pesquisas anteriores demonstraram que a concentração de 100  $\mu$ M de BME promoveu aumento na concentração de GSH intracelular (Takahashi *et al.*, 1993) e, também, resultou em melhores taxas de sobrevivência e qualidade de embriões bovinos vitrificados, quando adicionada ao meio de cultivo após a vitrificação (Nedambale *et al.*, 2006). Baseado nesses achados, foi adotada essa concentração no presente estudo.

Adicionalmente, buscou-se avaliar os efeitos da suplementação do meio de cultivo pós-aquecimento com BME na sobrevivência, índice oxidativo e número total de células de embriões vitrificados aquecidos. A criotolerância embrionária pós-aquecimento foi avaliada pela taxa de reexpansão dos embriões vitrificados cultivados com e sem BME (V+ e V-) em 0, 2 e 4 horas pós-aquecimento. De acordo com o estudo de Inaba e colaboradores (2016), maiores taxas de reexpansão de blastocistos vitrificados são observadas entre 4 e 20 horas no cultivo pós-aquecimento.

Ao contrário do esperado, no presente estudo, observou-se que a taxa de reexpansão dos embriões vitrificados cultivados com ou sem antioxidante (V+ e V-) não diferiram nos diferentes momentos avaliados (0, 2 e 4 h pós-aquecimento). Contudo, resultados semelhantes já foram demonstrados em trabalhos anteriores onde o cultivo de blastocistos bovinos com BME, na mesma concentração empregada resultou em taxas de reexpansão semelhantes entre embriões vitrificados aquecidos cultivados com e sem BME (Rocha-Frigoni *et al.*, 2014; De Mattos *et al.*, 2022), apesar dos protocolos referentes à vitrificação, aquecimento e período de avaliação (24 h e 12 h, respectivamente) terem sido diferentes do presente estudo. Por outro lado, Nedambale *et al.* (2006) observaram maiores taxas de reexpansão em embriões cultivados com BME quando comparados aos embriões controle.

Acredita-se que as taxas de reexpansão similares observadas no presente estudo entre embriões vitrificados cultivados com e sem antioxidante (V+ e V-) possam estar associadas à técnica empregada para o aquecimento dos embriões do presente trabalho. Como relatado em estudo anterior de nosso laboratório (Oliveira *et al.*, 2020), a técnica de aquecimento utilizada no presente trabalho, em coluna de meio (0,15 M de sacarose), promoveu maiores taxas de reexpansão (95%) em embriões vitrificados aquecidos, quando comparados à metodologia tradicional de aquecimento, em duas etapas.

Independente da presença ou ausência de BME, a taxa de eclosão dos embriões vitrificados (V+ e V-) se manteve similar em relação aos embriões frescos que não foram cultivados com BME (F-). Esse achado corrobora com o estudo de Fidelis (2013), onde não foi observada diferença na taxa de eclosão de blastocistos expandidos submetidos ao cultivo pós-

aquecimento com e sem 100  $\mu\text{M}$  de BME. Ao contrário dos resultados do presente estudo, De Mattos *et al.* (2022) relataram que o cultivo pós-aquecimento de embriões vitrificados na presença de BME, na mesma concentração, promoveu aumento da taxa de eclosão quando comparado aos blastocistos do grupo controle. Provavelmente, a diferença apresentada em relação aos resultados do presente estudo esteja relacionada ao tempo de exposição ao antioxidante. No estudo anterior, os embriões foram cultivados durante 72 h enquanto que no presente estudo foram cultivados por 48 h. Acreditamos que o cultivo durante 48 h possa ter limitado o desenvolvimento celular, resultando em menores taxas de eclosão.

Embora embriões frescos e vitrificados aquecidos (com e sem BME) não tenham diferido quanto à taxa de eclosão, o que pode estar relacionado às boas condições laboratoriais do presente estudo, outro resultado inesperado foi a ausência de redução significativa no índice oxidativo dos embriões cultivados na presença desse antioxidante. Este dado corrobora o estudo de Rocha-Frigoni *et al.* (2014), onde não foi observada a redução nos níveis de EROs presentes em embriões cultivados com BME na mesma concentração. É possível que o resultado verificado no presente estudo esteja relacionado ao momento adotado para a mensuração dos níveis de EROs (final do cultivo - 48 h) e que durante o período de cultivo os embriões vitrificados cultivados com BME tenham alcançado o equilíbrio redox intracelular, justificando o presente resultado. A homeostase redox intracelular, por sua vez, é alcançada quando ocorre um equilíbrio entre a síntese e eliminação de EROs (Marengo *et al.*, 2016). Caso a avaliação em questão fosse realizada no início do cultivo, o resultado poderia ser diferente visto que nesse momento os embriões não teriam o tempo suficiente para se recuperarem do estresse oxidativo promovido pela vitrificação e aquecimento.

Confirmando a hipótese de que a atenuação das concentrações de EROs poderia melhorar a qualidade dos embriões vitrificados, em níveis semelhantes aos observados em embriões frescos, foi verificado que a suplementação do meio de cultivo pós-aquecimento com 100  $\mu\text{M}$  de BME apresentou efeito benéfico sobre o número total de células. Esse achado, por sua vez, é um indício de maior qualidade dos embriões vitrificados (V+) uma vez que os resultados obtidos foram semelhantes àqueles observados em embriões frescos (F+ e F-). Esse achado corrobora outras pesquisas que relataram que o tratamento de embriões vitrificados aquecidos com a mesma concentração de BME promoveu melhorias na qualidade embrionária (Nedambale *et al.*, 2006; De Mattos *et al.*, 2022), ainda que a metodologia de vitrificação, aquecimento e momento de avaliação (De Mattos *et al.*, 2022) adotados tenham diferido do presente estudo.

## **8 CONCLUSÃO**

Em nossas condições experimentais, a vitrificação e o aquecimento apresentaram influência no aumento da síntese de EROs e, conseqüentemente, na indução do estresse oxidativo embrionário.

A atenuação das concentrações de EROs, por meio do cultivo pós-aquecimento com beta-mercaptoetanol, não melhorou a sobrevivência, mas promoveu aumento no número total de células em embriões vitrificados, sinalizando um possível benefício sobre a qualidade embrionária.

## 9 REFERÊNCIAS

- ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 61, n. 1, p. 57-66, 2002.
- ABEYDEERA, L. R.; WANG, W. H.; CANTLEY, T. C. *et al.* Presence of beta-mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured in vitro and the rate of blastocyst development after in vitro fertilization. *Theriogenology*, v. 50, n. 5, p. 747-56, 1998.
- AGARWAL, A.; ROSAS, I. M.; ANAGNOSTOPOULOU, C. *et al.* Oxidative Stress and Assisted Reproduction: A Comprehensive Review of Its Pathophysiological Role and Strategies for Optimizing Embryo Culture Environment. *Antioxidants (Basel)*, v. 11, n. 3:477, p. 1-22, 2022.
- ALI, J.; SHELTON, J. N. Vitrification of preimplantation stages of mouse embryos. *J. Reprod. Fertil.*, v. 98, n. 2, p. 459-465, 1993.
- AMARAL, C. S.; KOCH, J.; CORREA, E. E. J. *et al.* Heat stress on oocyte or zygote compromises embryo development, impairs interferon tau production and increases reactive oxygen species and oxidative stress in bovine embryos produced in vitro. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 87, n. 8, p. 899-909, 2020.
- AMBEKAR, A. S.; NIRUJOGI, R. S.; SRIKANTH, S. M. *et al.* Proteomic analysis of human follicular fluid: a new perspective towards understanding folliculogenesis. *J. Proteome*, v. 87, p. 68-77, 2013.
- AMBRUOSI, B.; LACALANDRA, G. M.; IORGA, A. I. *et al.* Cytoplasmic lipid droplets and mitochondrial distribution in equine oocytes: Implications on oocyte maturation, fertilization and developmental competence after ICSI. *Theriogenology*, v. 71, n. 7, p. 1093-1104, 2009.
- ANDRADE, E. R.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 34, n. 2, p. 79-85, 2010.
- ARAÚJO, M. S.; GUASTALI, M. D.; VOLPATO, R.; LANDIM, F. C. Principais mecanismos envolvidos na maturação oocitária em bovinos: da oogênese à maturação in vitro. *Enciclopédia Biosfera*, v. 10, n. 18, p. 2373-2388, 2014.
- ARIAS, M. E.; VARGAS, T.; GALLARDO, V. *et al.* Simple and Efficient Chemically Defined In Vitro Maturation and Embryo Culture System for Bovine Embryos. *Animals*, v. 12, n. 3057, p. 1-13, 2022.
- ARSHAD, U.; SAGHEER, M.; GONZÁLEZ-SILVESTRY, F. B. *et al.* Vitrification improves in-vitro embryonic survival in *Bos taurus* embryos without increasing pregnancy rate post embryo transfer when compared to slow-freezing: A systematic meta-analysis. *Cryobiology*, v. 101, p. 1-11, 2021.

- ASSIS, P. M.; CASTRO, L. S.; SIQUEIRA, A. F. P. *et al.* System for evaluation of oxidative stress on in-vitro-produced bovine embryos. *Reprod. Biomed. Online*, v. 31, n.4, p.577-580, 2015.
- BAHRAMI, M.; MORRIS, M. B.; DAY, M. L. Amino acid supplementation of a simple inorganic salt solution supports efficient in vitro maturation (IVM) of bovine oocytes. *Sci. Rep.*, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quím. Nova*, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.
- BARJA, G. Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated: implications for aging studies. *Rejuvenation Res.*, v. 10, p. 215-223, 2007.
- BARNES, F. L.; FIRST, N. L. Embryonic transcription in in vitro cultured bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 29, p. 117–123, 1991.
- BEDAIWY, M.; AGARWAL, A.; SAID, T. *et al.* Role of total antioxidant capacity in the differential growth of human embryos in vitro. *Fertil. Steril.*, v. 86, p. 304–309, 2006.
- BERGLUND, B. Genetic improvement of dairy cow reproductive performance. *Reprod. Domest. Anim.*, v. 43, n. 2, p. 89–95, 2008.
- BETTERIDGE, D. J. What is oxidative stress? *Metabolism.*, v. 49, n. 2, p. 3-8, 2000.
- BOTTA, D.; ARRUDA, R. P.; WATANABE, Y. F. *et al.* Influence of post-thawing thermal environment on bovine sperm characteristics and in vitro fertility. *Andrologia*, v. 51, n. 6, 2019.
- BOUQUET, A.; JUGA, J. Integrating genomic selection into dairy cattle breeding programmes: a review. *Animal*, v. 7, n. 5, p. 705–713, 2013.
- BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; MORIN, N. *et al.* In vitro embryo production in the cow: na effective alternative to the conventional embryo production approach. *Theriogenology*, v. 51, p. 59-70, 1999.
- BRACKETT, B. G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M. L. *et al.* Pregnancy following cow in vitro fertilization. *Biol. Reprod.* n. 24, v. 1, p. 173-190, 1981.
- BRACKETT, B. G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M. L. *et al.* Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol. Reprod.*, v. 27, p. 147-158, 1982.
- BREIBART, H.; NAOR, Z. Protein kinases in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Ver. Reprod.*, v. 4, n. 3, p. 151-159, 1999.
- BRINKHOF, B.; VAN TOL, H. T. A.; KOERKAMP, M. A. G. *et al.* Characterization of bovine embryos cultured under conditions appropriate for sustaining human naïve pluripotency. *PLoS One*, v. 12, n. 2, 2017.
- BUDANI, M. C.; TIBONI, G. M. Effects of supplementation with natural antioxidants on

oocytes and preimplantation embryos. *Antioxidants*, v. 9, n. 7:612, p. 1-25, 2020.

CAAMAÑO, J. N.; RYOO, Z. Y.; YOUNGS, C. R. Promotion of development of bovine embryos produced in vitro by addition of cysteine and beta-mercaptoethanol to a chemically defined culture system. *J. Dairy Sci.*, v. 81, n. 2, p. 369-374, 1998.

CAAMAÑO, J. N.; GÓMEZ, E.; TRIGAL, B. *et al.* Survival of vitrified in vitro-produced bovine embryos after a one-step warming in-straw cryoprotectant dilution procedure. *Theriogenology*, v. 83, n. 5, p. 881-890, 2015.

CARABATSOS, M. J.; SELBITTO, C.; GOODENOUGH, D. A.; ALBERTINI, D. F. Oocyte-granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. *Develop. Biol.*, v. 226, n. 2, p. 167-79, 2000.

CARVALHO, A. A.; FAUSTINO, L. R.; FIGUEIREDO, J. R. *et al.* Vitricificação: uma alternativa para a preservação de embriões e material genético de fêmeas mamíferas em criobancos. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 5, n. 3, p. 236-248, 2011.

CENTOLA, G. M.; HERKO, R.; ANDOLINA, E.; WEISENSEL, S. Comparison of sperm separation methods: effect on recovery, motility, motion parameters, and hyperactivation. *Fertil. Steril.* v. 70, p. 1173-1175, 1998.

CHATTERJEE, S.; GAGNON, C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 59, n. 4, p. 451-458, 2001.

CHEN, S. U.; LIEN, Y. R.; CHENG, Y. Y. *et al.* Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. *Hum. Reprod.*, v. 16, p. 2350-2356, 2001.

CHOUHDARY, K. K.; KAVYA, K. M.; JEROME, A.; SHARMA, R. K. Advances in reproductive biotechnologies. *Vet. World*, v. 9, n. 4, p. 388-395, 2016.

COVARRUBIAS, L.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, D.; SCHNABEL, D. *et al.* Function of reactive oxygen species during animal development: passive or active? *Dev. Biol.*, v. 320, n. 1, p. 1-11, 2008.

CORMIER, N.; SIRARD, M. A.; BAILEY, J. L. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J. Androl.*, v. 18, p. 461-468, 1997.

CRAN, D. G.; MOOR, R. M. Programming the oocyte for fertilization. *Fertilization in Mammals*. Roldan ERS (Ed.), p. 35-50, 1990.

DALCIN, L.; SILVA, R. S.; PAULINI, F. *et al.* Cytoskeleton structure, pattern of mitochondrial activity and ultrastructure of frozen or vitrified sheep embryos. *Cryobiology*, v. 67, n. 2, p. 137-145, 2013.

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

DELUAO, J. C.; WINSTANLEY, Y.; ROBKER, R. et al. Oxidative stress and reproductive function: Reactive oxygen species in the mammalian pre-implantation embryo. *Reproduction*, v. 164, n. 6, p. 95-108, 2022.

DE MATOS, DG; FURNUS, CC. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology*, v. 53, n. 3, p. 761-771, 2000.

DE MATTOS, K; PENA-BELLO, C; CAMPAGNOLO, K et al.  $\beta$ -Mercaptoethanol in culture medium improves cryotolerance of in vitro-produced bovine embryos. *Zygote*, v. 30, n. 6, p. 830-840 (abstract), 2022.

DINNYES, A.; DAI, Y.; JIANG, S.; YANG, X. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod.*, v. 63, p. 513–518, 2000.

DO, V.; WALTON, S.; TAYLOR-ROBINSON, A. Benefits and constraints of vitrification technologies for cryopreservation of bovine in vitro fertilized embryos. *J. Vet. Sci. Anim. Husb.*, v. 2, n. 4, p. 1-5, 2014.

DODE, M. A. N.; LEME, L. O.; SPRICIGO, J. F. W. Criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 37, p. 145-150, 2013.

DOWLING, D. K.; SIMMONS, L. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proc. Biol. Sci.*, v. 276, p. 1737-1745, 2009.

DUCIBELLA, T. The cortical reaction and development of activation competence in mammalian oocytes. *Hum. Reprod. Update*, v. 2, p. 29-42, 1996.

EALY, A. D; WOOLDRIDGE, L. K; MCCOSKI, S. R. Post-transfer consequences of in vitro-produced embryos in cattle. *J. Anim. Sci.*, v. 97, n. 6, p. 2555-2568, 2019.

EDWARDS, R. G. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey, and human ovarian oocytes. *Nature*, v. 208, p. 349-351, 1965.

FERREIRA, E. M.; VIREQUE, A. A.; ADONA, P. R. et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, v. 71, n. 5, p. 836-848, 2009.

FERRÉ, L. B; KJELLAND, M. E; STROBECH, L. B et al. Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, v. 5, p. 1-14, 2019.

FIDELIS, A. A. G. Antioxidantes associados à pressão hidrostática sobre a viabilidade embrionária pós desvitrificação. 2013. 51f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Medicina Veterinária.

FISCHER, B.; BAVISTER, B. D. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J. Reprod. Fertil.*, v. 99, n. 2, p. 673-679, 1993.

- FUJII, J.; IUCHI, Y.; OKADA, F. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, v. 3, p. 1–10, 2005.
- GADELLA, B. M. Interaction of sperm with the zona pellucida during fertilization. *Soc Reprod. Fertil. Suppl.*, v. 67, p. 267-287, 2010.
- GANDHI, A. P.; LANE, M.; GARDNER, D. K.; KRISHER, R. L. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. *Hum. Reprod.*, v. 15, n. 2, p. 395-401, 2000.
- GARDINER, C. S.; REED, D. J. Synthesis of glutathione in the preimplantation mouse embryo. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 318, p. 30–36, 1995.
- GARDINER, C. S.; SALMEN, J. J.; BRANDT, C. J.; STOVER, S. K. Glutathione is present in reproductive tract secretions and improves development of mouse embryos after chemically induced glutathione depletion. *Biol. Reprod.*, v. 59, p. 431–436, 1998.
- GAVIRIA, S. M.; HERRERA, L. A.; URREGO, R. *et al.* Effect of resveratrol on vitrified in vitro produced bovine embryos: Recovering the initial quality. *Cryobiology*, v. 89, p. 42-50, 2019.
- GÓMEZ, H.; CARROCERA, S.; MARTÍN, D. *et al.* Efficient one-step direct transfer to recipients of thawed bovine embryos cultured in vitro and frozen in chemically defined medium. *Theriogenology*, v. 146, p. 39-47, 2020.
- GONÇALVES, P. B. D.; BARRETA, M. R.; SANDRI, L. C. *et al.* Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 31, n. 2, p. 212-217, 2007.
- GORDON, I. Laboratory production of cattle embryos. Maturing the bovine oocyte. 2.ed. Cambridge University Press, cap. 4, p. 112- 157, 2003.
- GOTO, Y.; NODA, Y.; MORI, T.; NAKANO, M. Increased generation of reactive oxygen species in embryo cultured in vitro. *Free Rad. Biol. Med.*, v. 15, p. 69–75, 1993.
- GRAF, A.; KREBS, S.; HEININEN-BROWN. *et al.* Genome activation in bovine embryos: review of the literature and new insights from RNA sequencing experiments. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 149, p. 46-58, 2014.
- GUÉRIN, P.; MOUATASSIM, S.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum. Reprod. Update*, v. 7, n. 2, p. 175-189, 2001.
- GUTNISKY, C; MORADO, S; GADZE, T. Morphological, biochemical and functional studies to evaluate bovine oocyte vitrification. *Theriogenology*, v. 143, p. 18-26, 2020.
- HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. *Lancet*, v. 355, p. 1179-1180, 2000.
- HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants - quo vadis? *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 32, p. 125–130, 2011.
- HAMAWAKI, A.; KUWAYAMA, M.; HAMANO, S. Minimum volume cooling method for

- bovine blastocyst vitrification. *Theriogenology*, v. 51, n. 1, p. 165 (abstract), 1999.
- HANCOCK, J.T.; DESIKAN, R.; NEILL, S.J. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem. Soc. Trans.*, v. 29, p. 345-350, 2001.
- HARA, T.; KIN, A.; AOKI, S. et al. Resveratrol enhances the clearance of mitochondrial damage by vitrification and improves the development of vitrified-warmed bovine embryos. *PLoS One*, v. 13, n. 10:e0204571, p. 1-17, 2018.
- HARDY, M. L. M.; DAY, M. L.; MORRIS, M. B. Redox Regulation and Oxidative Stress in Mammalian Oocytes and Embryos Developed In Vivo and In Vitro. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, v. 18, n. 21:11374, p. 1-27, 2021.
- HASHIMOTO, S.; NISHIHARA, T.; MURATA, Y. et al. Medium without ammonium accumulation supports the developmental competence of human embryos. *J. Reprod. Dev.*, v. 54, n. 5, p. 370-374, 2008.
- HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, E. O.; SOSNIK, J.; EDWARDS, J. et al. Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm. *J. Biol. Chem.*, v. 281, n. 9, p. 5623-5633, 2006.
- HOCHACHKA, P. Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science*, v. 231, n. 80, p. 234-241, 1986.
- HOSSEINI, S. M; FOROUZANFAR, M; HAJIAN, M et al. Antioxidant supplementation of culture medium during embryo development and/or after vitrification-warming; which is the most important? *J. Assist. Reprod. Genet.*, v. 26, n. 6, p. 355-364, 2009.
- HYTTEL, P.; XU, K. P.; SMITH, S.; GREVE, T. Ultrastructure of in vitro oocyte maturation in cattle. *J. Reprod. Fertil.*, v. 78, p. 615-625, 1986.
- ICKOWICZ, D.; FINKELSTEIN, M.; BREIBART, H. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian. J. Androl.*, v. 14, n. 6, p. 816-821, 2012.
- INABA, Y.; MIYASHITA, S.; SOMFAI, T. Cryopreservation method affects DNA fragmentation in trophectoderm and the speed of re-expansion in bovine blastocysts. *Cryobiology*, v. 72, n. 2, p. 86-92, 2016.
- ISSELS, R. D.; NAGELE, A.; ECKERT, K. G.; WILMANN, W. Promotion of cystine uptake and its utilization for glutathione biosynthesis induced by cysteamine and N-acetylcysteine. *Biochem Pharmacol.*, v. 37, n. 5, p. 881-888, 1988.
- JAMIL, M.; DEBBARH, H.; ABOULMAOUAHIB, S. et al. Reactive oxygen species in reproduction: harmful, essential or both? *Zygote*, v. 28, p. 255-269, 2020.
- JONES, K. T. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *Mol. Hum. Reprod.*, v. 10, n. 1, p. 1-5, 2004.
- JOHNSON, M. H.; NASR-ESFAHANI, M. H. Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation

mammalian embryos in vitro? *Bioessays*, v. 16, p. 31–38, 1994.

KARAMAHMUTOGLU, H.; ERDEM, A.; ERDEM, M. *et al.* The gradient technique improves success rates in intrauterine insemination cycles of unexplained subfertile couples when compared to swim up technique; a prospective randomized study. *J. Assist. Reprod. Genet.*, v. 31, n. 9, p. 1139-1145, 2014.

KEHRER, J. P.; KLOTZ, L. O. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health. *Crit. Ver. Toxicol.*, v. 45, n. 9, p. 765-798, 2015.

KESHAVARZI, S.; EFTEKHARI, A. D.; VAHABZADEH, H. *et al.* A comparative study of post-warming survival rates and clinical outcomes of human blastocysts vitrified/warmed by CryoTouch and Cryotop methods. *JBRA Assist. Reprod.*, v. 26, n. 4, p. 568-573, 2022.

KOPF, G. S.; VISCONTI, P. E.; GALANTINO-HOMER, H. K. Advances in Developmental Biochemistry. Capacitation of the mammalian spermatozoon, v. 5, p. 81–105, 1999.

KUPKER, W.; DIEDRICH, K.; EDWARDS, R. G. Principles of mammalian fertilization. *Hum. Reprod.*, v. 13, n. 1, p. 20-32, 1998.

KUWAYAMA, M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology*, v. 67, n. 1, p. 73-80, 2007.

LANDIM-ALVARENGA, F. C.; MAZIERO, R. R. D. Control of oocyte maturation. *Anim. Reprod.*, v. 11, n. 3, p. 150-158, 2014.

LANDIM-ALVARENGA, F. C.; PRESTES, N. C. Obstetrícia veterinária. Fecundação e clivagem. 1ªEd. Guanabara Koogan, cap. 1, p. 1-21, 2006.

LANE, M.; SCHOOLCRAFT, W. B.; GARDNER, D. K. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil. Steril.*, v. 72, p. 1073–1078, 1999.

LEITE, R. F.; ANNES, K.; ISPADA, J. *et al.* Oxidative Stress Alters the Profile of Transcription Factors Related to Early Development on In Vitro Produced Embryos. *Oxid Med. Cell. Longev.*, v. 2017, (2017):1502489, 2018.

LEME, L. O.; DUFORT, I.; SPRICIGO, J. F. W. *et al.* Effect of vitrification using the Cryotop method on the gene expression profile of in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*, v. 85, n. 4, p. 724-733, 2016.

LIMA, M. R. Efeitos de reguladores do metabolismo lipídico no desenvolvimento in vitro de embriões bovinos e na sobrevivência à vitrificação. 2015. 74f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal.

LIN, M. T; BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, v. 443(7113), p. 787-795, 2006.

LIN, J.; WANG, L. Oxidative Stress in Oocytes and Embryo Development: Implications for In

Vitro Systems. *Antioxid. Redox. Signal.*, v. 34, n. 17, p. 1-38, 2020.

LINDNER, G. M.; WRIGHT, R. W. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, v. 20, n. 4, p. 407-416, 1983.

LONERGAN, P.; KHATIR, H.; PIUMI, F. *et al.* Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. *J. Reprod. Fertil.*, v. 117, p. 159-167, 1999.

LONERGAN, P.; FAIR, T.; FORDE, N.; RIZOS, D. Embryo development in dairy cattle. *Theriogenology*, v. 86, n. 1, p. 270-277, 2016.

LÓPEZ-DAMIÁN, E. P.; JIMÉNEZ-MEDINA, J. A.; ALARCÓN, M. A. *et al.* Cryopreservation induces higher oxidative stress levels in *Bos indicus* embryos compared with *Bos taurus*. *Theriogenology*, v. 143, p. 74-81, 2020.

LUBERDA, Z. The role of glutathione in mammalian gametes. *Reprod. Biol.* v. 5, p. 5-17, 2005.

LUVONI, G. C.; KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B. G. Improvement in bovine embryo production in vitro by glutathione-containing culture media. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 43, p. 437-443, 1996.

MAIA, M. S.; BICUDO, S. D.; SICHERLE, C. C. *et al.* Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 122, n. 1-2, p. 118-123, 2010.

MARENGO, B.; NITTI, M.; FURFARO, A. L. *et al.* Redox Homeostasis and Cellular Antioxidant Systems: Crucial Players in Cancer Growth and Therapy. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, v. 2016:6235641, p. 1-16, 2016.

MARTÍNEZ-RODERO, I.; GARCÍA-MARTÍNEZ, T.; ORDÓÑEZ-LEÓN, E. A. *et al.* A Shorter Equilibration Period Improves Post-Warming Outcomes after Vitrification and in Straw Dilution of In Vitro-Produced Bovine Embryos. *Biology*, v. 10, n. 2, 142, p. 1-15, 2021.

MARTINO, N. A.; DELL'AQUILA, M. E.; CARDONE, R. A. *et al.* Vitrification preserves chromatin integrity, bioenergy potential and oxidative parameters in mouse embryos. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, v. 11, p. 11-27, 2013.

MATTOS, K. Efeito do  $\beta$ -mercaptoetanol na criotolerância à vitrificação em embriões bovinos produzidos in vitro. 2019. 47f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.*, v. 247, n. 3, p. 125-142, 1984.

MEZZALIRA, A. E.; VIEIRA, A. D. Criopreservação de oócitos e embriões bovinos. *Acta Sci. Vet.*, v. 34, p. 191-196, 2006.

MEIRELLES, F. V.; CAETANO, A. R.; WATANABE, Y. F. *et al.* Genome activation and

developmental block in bovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 82/83, p. 13-20, 2004.

MELLO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; SOUSA, S. L. G. *et al.* Produção in vitro (PIV) de embriões bovinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 40, n. 2, p. 58-64, 2016.

MITTLER, R; VANDERAUWERA, S; SUZUKI, N *et al.* ROS signaling: the new wave? *Trends Plant. Sci.*, v. 16, n. 6, p. 300-309, 2011.

MOUSSA, H.; QUEZADA, E.; VIÑA, D. *et al.* Redox-Active Phenolic Compounds Mediate the Cytotoxic and Antioxidant Effects of *Carpodesmia tamariscifolia* (=Cystoseira tamariscifolia). *Chem. Biodivers.*, v. 17, n. 7:e 2000121, 2020.

MORATÓ, R.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, M. T.; MOGAS, T. Survival and apoptosis rates after vitrification in cryotop devices of in vitro-produced calf and cow blastocysts at different developmental stages. *Reprod. Fertil. Dev.*, v. 22, n. 7, p. 1141-1147, 2010.

NAJAFZADEH, V.; SECHER, J.B.M.; PIHL, M. *et al.* Vitrification yields higher cryo-survival rate than slow freezing in biopsied bovine in vitro produced blastocysts. *Theriogenology*, v. 171, p. 44-54, 2021.

NASR-ESFAHANI, M. H.; JOHNSON, M. H. How does transferrin overcome the in vitro block to development of the mouse preimplantation embryo? *J. Reprod. Fertil.*, v. 96, n. 1, p. 41-48, 1992.

NEDAMBALE, T. L.; DU, F.; YANG, X.; TIAN, X. C. Higher survival rate of vitrified and thawed in vitro produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with beta-mercaptoethanol. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 93, p. 61-75, 2006.

NEHA, K.; HAIDER, M. R.; PATHAK, A.; YAR, M. S. Medicinal prospects of antioxidants: a review. *Eur. J. Med. Chem.*, v. 178, p. 687-704, 2019.

NOHALEZ, A.; MARTINEZ, C. A.; PARRILA, I. *et al.* Exogenous ascorbic acid enhances vitrification survival of porcine in vitro-developed blastocysts but fails to improve the in vitro embryo production outcomes. *Theriogenology*, v. 113, p. 113-119, 2018.

NORRIS, R. P.; FREUDZON, M.; MEHLMANN, L. M. *et al.* Luteinizing hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption. *Development*, v. 135, p. 3229-3238, 2008.

OLIVEIRA, C. S.; FEUCHARD, V. L. S.; FREITAS, C. *et al.* In-straw warming protocol improves survival of vitrified embryos and allows direct transfer in cattle. *Cryobiology*, v. 97, p. 222-225, 2020.

OHATA, K; EZOE, K; MIKI, T. *et al.* Effects of fatty acid supplementation during vitrification and warming on the developmental competence of mouse, bovine and human oocytes and embryos. *Reprod. Biomed. Online*, v. 43, n. 1, p. 14-25, 2021.

OKO, R.; SUTOVSKY, P. Biogenesis of sperm perinuclear theca and its role in sperm functional competence and fertilization. *J. Reprod. Immunol.*, v. 83, n. 1-2, p. 2-7, 2009.

- OSHIO, S. Apparent densities of spermatozoa of various mammalian species. *Gamete Res.*, v. 20, p. 159–164, 1988.
- PALHARES, R. C. F. T. Dinâmica da maturação nuclear e citoplasmática de oócitos bovinos cultivados in vitro em meio suplementado com fulerol. 2020. 61f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- PAPAHARAMABUS, C. A.; GRIENDLING, K. K. Basic mechanisms of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury. *Trends Cardiovasc. Med.*, v. 17, n. 2, p. 48–54, 2007.
- PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, J.; WINER, M. A.; FIRST, N. L. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.*, v. 38, n. 5, p. 1171-1180, 1988.
- PARRISH, J. J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J. L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology*, v. 44, n. 6, p. 859 -869, 1995.
- PATEL, P. A.; CHAUDHARY, S. S.; PURI, G. *et al.* Effects of  $\beta$ -mercaptoethanol on in vitro maturation and glutathione level of buffalo oocytes. *Vet. World.*, v. 8, n. 2, p. 213-216, 2015.
- PEDERSEN, H. S; MAZZONI, G.; STROEBECH, L. *et al.* Basic and practical aspects of pregnancy establishment in cattle. *Anim. Reprod.*, v. 14, n. 3, p. 581-588, 2017.
- PEGG, D. E. The role of vitrification techniques of cryopreservation in reproductive medicine. *Hum. Fertil (Camb).*, v. 8, n. 4, p. 231-239, 2005.
- PEREIRA, R. M.; MARQUES, C. C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell. Tissue Bank.*, v. 9, p. 267-277, 2008.
- PEREIRA, M. M.; MACHADO, M. A.; COSTA, F. Q. Effect of oxygen tension and serum during IVM on developmental competence of bovine oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.*, v. 22, p. 1074–1082, 2010.
- POLLARD, J. W.; LEIBO, S. P. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology*, v. 41, p. 101-106, 1994.
- PICTON, H.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v. 145, p. 27-37, 1998.
- RALL, W. F.; FAHY, G. M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature*, v. 313, p. 573-575, 1985.
- REDZA-DUTORDOIR, M.; AVERILL-BATES, D. A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1863, n. 12, p. 2977-2992, 2016.
- ROCHA-FRIGONI, N. A. S.; LEÃO, B. C. S.; NOGUEIRA, E. *et al.* Reduced levels of

intracellular reactive oxygen species and apoptotic status are not correlated with increases in cryotolerance of bovine embryos produced in vitro in the presence of antioxidants. *Reprod. Fertil. Dev.*, v. 26, n. 6, p. 797-805, 2014.

RODRIGUES, J. Aspectos da congelação de embriões bovinos. Reunião anual da sociedade brasileira de transferência de embriões, p. 55-79, 1992.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenology*, v. 68, p. 138-146, 2007.

ROELEN, B. A. J. Bovine oocyte maturation: acquisition of developmental competence. *Reprod. Fertil. Dev.*, v. 32, n. 2, p. 98-103, 2020.

ROZOY, E.; SIMARD, S.; LIU, Y. *et al.* The use of cyclic voltammetry to study the oxidation of 1-5-methyltetrahydrofolate and its preservation by ascorbic acid. *Food Chem.*, v. 132, p. 1429–1435, 2012.

SAMARDZIJA, M., DOBRANIC, T., KARADJOLE, M. *et al.* The Efficacy of Gradient Percoll on Bull Sperm Separation for In Vitro Fertilization. *Veterinarski Arhiv.*, v. 76, n. 1, p. 37-44, 2006.

SANCHES, B. V.; ZANGIROLAMO, A. F.; SILVA, N. C. *et al.* Cryopreservation of in vitro-produced embryos: challenges for commercial implementation. *Anim. Reprod.*, v. 14, n. 3, p. 521-527, 2017.

SARAGUSTY, J.; ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*, v. 141, n. 1, p. 1-19, 2011.

SCHULZ, K.N; HARRISON, M.M. Mechanisms regulating zygotic genome activation. *Nat. Rev. Genet.*, v. 20, n. 4, p. 221–234, 2019.

SEIDEL, G. E. Superovulation and embryo transfer in cattle. *Science*, v. 211, n. 4480, p.351-358, 1981.

SENEDA, M. M., BERGAMO, L. Z., MIGUEZ-GONZÁLEZ, S. *et al.* Oogênese e Foliculogênese em Bovinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 45, n. 4, p. 323-328, 2021.

SEPÚLVEDA, B.; ARIAS, M. E.; AGUILA, L. *et al.* Gradient sperm selection for reproductive techniques in cattle: Is Isolate a suitable replacement for Percoll? *Andrologia*, v. 50, n. 3, 2018.

SHIELDS, H. J; TRAA, A.; RAAMSDONK, J. M. V. Beneficial and Detrimental Effects of Reactive Oxygen Species on Lifespan: A Comprehensive Review of Comparative and Experimental Studies. *Front. Cell. Dev. Biol.*, v. 9:628157, 2021.

SIKKA, S. C. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr. Med. Chem.*, v. 8, n. 7, p. 851-862, 2001.

SIRARD, M. A.; FIRST, N. L. In vitro inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. *Biol. Reprod.*, v. 39, p. 229-234, 1988.

- SJUNNESSON, Y. In vitro fertilisation in domestic mammals-a brief overview. *Ups. J. Med. Sci.*, v. 125, n. 2, p. 68-76, 2020.
- SOMFAI, T; HARAGUCHI, S; DANG-NGUYEN, T. Q. *et al.* Vitrification of porcine immature oocytes and zygotes results in different levels of DNA damage which reflects developmental competence to the blastocyst stage. *PLoS One*, v. 18, n. 3, p. 1-19, 2023.
- SOTO-HERAS, S; PARAMIO, MT. Impact of oxidative stress on oocyte competence for in vitro embryo production programs. *Res. Vet. Sci.*, v. 132, p. 342-350, 2020.
- STEPONKUS, P. L.; MYERS, S. P.; LYNCH, D. V. *et al.* Cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos. *Nature*, v. 345, p. 170–172, 1990.
- STIVAL, C.; PUGA, L. C. P.; PAUDEL, B. *et al.* Advances in anatomy, embryology, and cellbiology. Sperm Capacitation and Acrosome Reaction in Mammalian Sperm., cap. 5, p. 93-106, 2016.
- STRICKER, S. A. Structural reorganization of the endoplasmic reticulum during egg maturation and fertilization. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, v. 17, p. 303-313, 2006.
- SUDANO, M. J; SANTOS, V. G; TATA, A. *et al.* Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro-and in vivo-produced blastocysts. *Biol. Reprod.*, v. 87, p. 1-11, 2012.
- SUN, X.; LI, Z.; YI, Y. *et al.* Efficient term development of vitrified ferret embryos using a novel pipette chambre technique. *Biol. Reprod.*, v. 79, p. 832–840, 2008.
- SWAIN, J. E. Controversies in ART: Can the IVF laboratory influence preimplantation embryo aneuploidy? *Reprod. Biomed. Online*, v. 39, p. 599–607, 2019.
- SWAIN, J.; SMITH, G. Fertility Cryopreservation. Cryoprotectants. In R. Chian & P. Quinn (Eds.). Cambridge: Cambridge University Press, cap. 4, p. 24-38, 2010.
- TAKAHASHI, M; NAGAI, T; HAMANO, S. *et al.* Effect of thiol compounds on in vitro development and intracellular glutathione content of bovine embryos. *Biol. Reprod.*, v. 49, n. 2, p. 228-232, 1993.
- TAKAHASHI, M.; KEICHO, K.; TAKAHASHI, H. *et al.* Effect of oxidative stress on development and DNA damage in in-vitro cultured bovine embryos by comet assay. *Theriogenology*. v. 54, n. 1, p. 137–145, 2000.
- TAKAHASHI, M.; NAGAI, T.; OKAMURA, N. *et al.* Promoting effect of beta-mercaptoethanol on in vitro development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos. *Biol. Reprod.*, v. 66, n. 3, p. 562–567, 2002.
- TAKENAKA, M.; HORIUCHI, T.; YANAGIMACHI, R. Effects of light on development of mammalian zygotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 104, n. 36, p. 14289-14293, 2007.
- TEBBOUB, I.; KECHRID, Z. Effect of curcuma on zinc, lipid profile and antioxidants levels in blood and tissue of streptozotocin-induced diabetic rats fed zinc deficiency diet. *Arch.*

*Physiol. Biochem.*, v. 19, p. 1–8, 2019.

TOYOKUNI, S. Iron-induced carcinogenesis: The role of redox regulation. *Free Radical Biol. Med.*, v. 20, p. 553-566, 1996.

TRAVIS, A. J.; KOPF, G. G. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J. Clin. Invest.*, v. 110, n. 6, p. 731-736, 2002.

TSANG, W. H.; CHOW, K. L. Mouse embryo cryopreservation utilizing a novel high-capacity vitrification spatula. *Biotechniques*, v. 46, p. 550–552, 2009.

VAJTA, G.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Vitrification of porcine embryos using the open pulled straw (OPS) method. *Acta Vet. Scand.*, v. 38, p. 349–352, 1997.

VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M. *et al.* Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 51, n. 1, p. 53-58, 1998.

VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, v. 65, p. 236-244, 2006.

VAJTA, G.; NAGY, Z. P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod. Biomed. Online.*, v. 12, n. 779–796, 2006.

VALADÃO, L.; SILVA, H. M.; SILVA, F. M. Embryology - Theory and Practice. Bovine Embryonic Development to Implantation. *IntechOpen*, cap. 6, p. 1-10, 2019.

VALOJERDI, M. R.; EFTEKHARI-YAZDI, P.; KARAMIAN, L. *et al.* Vitrification versus slow freezing gives excellent survival, post warming embryo morphology and pregnancy outcomes for human cleaved embryos. *J. Assist. Reprod. Genet.*, v. 26, n. 6, p. 347-354, 2009.

VANDERZWALMEN, P.; ECTORS, F.; PANAGIOTIDIS, Y. *et al.* The Evolution of the Cryopreservation Techniques in Reproductive Medicine - Exploring the Character of the Vitrified State Intra- and Extracellularly to Better Understand Cell Survival after Cryopreservation. *Reprod. Med.*, v. 1, p. 142-157, 2020.

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

VIANA, J. H. M.; SIQUEIRA, L. G. B.; PALHÃO, M. P.; CAMARGO, L. S. A. Use of in vitro fertilization technique in the last decade and its effect on Brazilian embryo industry and animal production. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 38, n. 2, p. 661–674, 2010.

WANG, X.; FALCONE, T.; ATTARAN, M. *et al.* Vitamin C and Vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. *Fertil. Steril*, v. 78, p. 1272-1277, 2002.

- WANG, Z. G.; YU, S. D.; XU, Z. R. Effect of supplementation of green tea polyphenols on the developmental competence of bovine oocytes in vitro. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 40, n. 8, p. 1079–1085, 2007.
- WATSON, A. J. The cell biology of blastocyst development. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 33, p. 492–504, 1992.
- WATSON, A. J.; BARCROFT, L. C. Regulation of blastocyst formation. *Front. Biosci.*, v. 6, p. 708–730, 2001.
- WESSEL, G. M., BROOKS, J.M., GREEN, E. *et al.* The biology of cortical granules. *Int. Rev. Cytol.*, v. 209, p. 117–206, 2001.
- WHITTINGHAM, D. G. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature*, v. 233, p. 125–126, 1971.
- WHITTINGHAM, D. G. Principles of embryo preservation. *Low Temperature Preservation in Medicine and Biology*, Pitman Medical, Tunbridge Wells, p. 65–83, 1980.
- XIAO, M.; ZHONG, H.; XIA, L. *et al.* Pathophysiology of mitochondrial lipid oxidation: Role of 4-hydroxynonenal (4-HNE) and other bioactive lipids in mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 111, p. 316–327, 2017.
- YANAGIMACHI, R. *Physiology of Reproduction. Mammalian fertilization.* Raven Press, New York, p. 189–317, 1995.
- YIN, H.; XU, L.; PORTER, N. A. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem. Rev.*, v. 111, n. 10, p. 5944–5972, 2011.
- YOU, J.; KIM, J.; LIM, J.; LEE, E. Anthocyanin stimulates in vitro development of cloned pig embryos by increasing the intracellular glutathione level and inhibiting reactive oxygen species. *Theriogenology*, v. 74, p. 777–785, 2010.
- ZARBAKSH, S. Effect of antioxidants on preimplantation embryo development in vitro: a review. *Zygote*, v. 29, n. 3, p. 179–193, 2021.
- ZAVOS, P. M. Preparation of human frozen-thawed seminal specimens using the SpermPrep filtration method: improvements over the conventional swim up method. *Fertil. Steril.* v. 57, p. 1326–1330, 1992.
- ZHENG, S.; NEWTON, G. L.; GONICK, G. *et al.* Radioprotection of DNA by thiols: relationship between the net charge on a thiol and its ability to protect DNA. *Radiat. Res.*, v. 114, n. 1, p. 11–27, 1988.
- ZHAO, X. M.; DU, W. H.; WANG, D. *et al.* Controlled Freezing and Open-Pulled Straw (OPS) Vitrification of In vitro Produced Bovine Blastocysts Following Analysis of ATP Content and Reactive Oxygen Species (ROS) Level. *J. Integrative Agric.*, v. 11, n. 3, p. 446–455, 2012.

ZHAO, X. M.; HAO, H. S.; DU, W. H. *et al.* Melatonin inhibits apoptosis and improves the developmental potential of vitrified bovine oocytes. *J. Pineal Res.*, v. 60, n. 2, p. 132-141, 2016.