

Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de Veterinária da UFMG
Programa de Pós-graduação em Ciência Animal

Características de embriões bovinos produzidos *in vitro* em meio
de cultivo suplementado com Cisteamina ou extrato oleoso de
Lippia Origanoides

Natália Vieira Sollecito

Belo Horizonte
2018

Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de Veterinária da UFMG
Programa de Pós-graduação em Ciência Animal

Características de embriões bovinos produzidos *in vitro* em meio
de cultivo suplementado com Cisteamina ou extrato oleoso de
Lippia Origanoides

Natália Vieira Sollecito

Tese apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciência Animal da
Escola de Veterinária da Universidade
Federal de Minas Gerais como requisito
parcial para Obtenção do grau de
Doutora em Ciência Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal
Professor Orientador: Alan Maia Borges
Professor Co-orientador: Antonio de Pinho Marques Jr

Belo Horizonte
2018

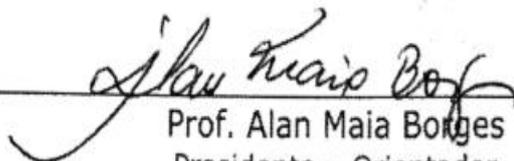
S688c Sollecito, Natália Vieira, 1986-
Características de embriões bovinos produzidos *in vitro* em meio de cultivo
suplementado com Cisteamina ou extrato oleoso de *Lippia Origanoides* / Natália
Vieira Sollecito. – 2018.
96 p. : il.

Orientador: Álan Maia Borges
Co-orientador: Antonio de Pinho Marques Jr
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

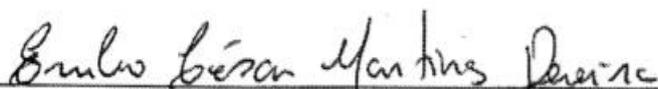
1. Bovino – Reprodução – Teses. 2. Bovino – Embrião – Teses. 3. Embrião –
Qualidade – Teses. 4. Reprodução animal – Teses. I. Borges, Álan Maia. II. Marques
Júnior, Antonio de Pinho. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de
Veterinária. IV. Título.

CDD – 636.208 926

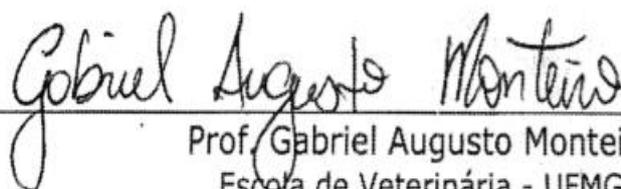
TESE defendida e aprovada em 06/04/2018 pela Comissão Examinadora composta pelos seguintes membros:



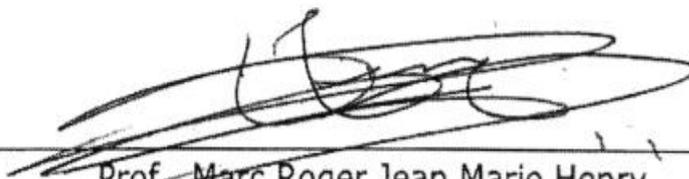
Prof. Alan Maia Borges
Presidente - Orientador



Prof. Emilio Cesar Martins Pereira
Faculdade Coromandel



Prof. Gabriel Augusto Monteiro
Escola de Veterinária - UFMG



Prof. Marc Roger Jean Marie Henry
Escola de Veterinária - UFMG



Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- EMBRAPA

“Todo caminho da gente é resvaloso.
Mas também, cair não prejudica demais
A gente levanta, a gente sobe, a gente volta!
O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim:
Esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa,
Sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem.
Ser capaz de ficar alegre e mais alegre no meio da alegria,
E ainda mais alegre no meio da tristeza...”
João Guimarães Rosa

Agradecimentos

Em primeiro lugar à **Deus**, que torna todas as coisas possíveis! Que tanto em momentos difíceis como nos de alegria esteve sempre amparando a minha alma e meu coração, me proporcionando paciência e sabedoria. Sou eternamente grata pela oportunidade desta existência! É Tua toda Glória!

A minha mãe, Maria Geralda Vieira Sollecito, por ser a força traduzida em amor. Por todo zelo e carinho de um amor que eu sei que é eterno e que me mantém viva e esperançosa. Por me ensinar a cada dia o quanto Deus é maravilhoso e como vale a pena viver por Ele e com Ele.

Ao meu pai, Robson Domingos Sollecito pelo exemplo de homem de caráter e fibra, que sempre me ensinou o valor das coisas certas.

À minha irmã e amiga, Amanda Vieira Sollecito, por todos os momentos em que você acreditou em mim e me fez mais forte pela caridade em me escutar e pela boa ação de me impulsionar a tomar um novo rumo, eu te amo.

Ao meu querido marido e amigo, Thiago Luis de Souza, por ter me apoiado tanto nesses últimos anos. Sempre me motivou e acreditou que eu era capaz de concluir essa etapa. Muito Obrigada pela cumplicidade! Te amo!

A todos da família Ramirez Miranda, principalmente aos meus amigos da alma, Elida e Evandro, amo vocês.

Aos meus amigos que tive o prazer de conhecer na pós-graduação, Beatriz Parzewski, Rafael Leão, Patrícia Auler, Jaci Almeida, Guilherme Andrade e Mayara Ferreira, que começaram comigo essa etapa da minha vida e fizeram toda a diferença! Ensinar-me muito e tornaram a jornada mais alegre!

Ao meu grande amigo Emílio, que me guiou muitas vezes quando eu tinha incertezas e dúvidas. Que me apoiou e ajudou tanto no que se referia ao meu experimento como na amizade. Você foi extremamente importante para que esse estudo fosse realizado até o fim!

Ao meu amigo João Gabriel, pelas ideias e parcerias durante todo esse tempo.

À Barbara Couto, por ser mais que uma aluna de iniciação científica, por ter se tornado a amiga que há muito eu precisava! Por me incentivar e me mostrar em tantas vezes o quanto eu sou capaz. Meu muito obrigada, pelos momentos de apoio e carinho!

Aos meus amigos da família Barbosa, Virgílio e Laíse que tanto me ajudaram nas atividades ligadas a esse experimento e que o fizeram sempre com muito carinho!

À Eliane Beatriz pela ajuda e auxílio nas atividades do laboratório durante esse experimento. E a todos os componentes do Laboratório de Fertilização *in vitro* da UFMG.

À Eliza que foi companheira dos desafios da biologia molecular e que doou muito de seu tempo e paciência para que tudo desse certo nesse trabalho.

A Escola de Veterinária da UFMG e aos professores do departamento de Ciência Animal, pelos conhecimentos transmitidos e pela oportunidade de crescimento profissional.

Ao meu orientador Professor Dr. Alan Maia Borges pela oportunidade de realizar esse trabalho que foi tão importante e que me ajudou em meu crescimento, tanto pessoal como profissional. Muito obrigada pelo carinho!

Ao meu co-orientador e amigo Professor Dr. Antonio de Pinho Marques Jr, pela paciência, apoio, confiança e respeito.

Ao Professor Dr. Marc Henry, por ceder gentilmente a Fazenda de Pedro Leopoldo para realização de parte desse trabalho e pelo incentivo.

Ao Professor Dr. Marcelo Emílio Belletti, que me recebeu com muito carinho, cedendo um espaço e tempo no Laboratório de Microscopia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), além de me ensinar muito sobre generosidade e parceria no meio acadêmico.

Ao Professor Dr. Luiz Sérgio por abrir as portas do Laboratório de Genética Molecular da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Gado de Leite, em Juiz de Fora, para que eu pudesse realizar parte crucial do meu experimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida. À Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Gado de leite pelo auxílio.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para esta conquista.
Agradeço de coração.

RESUMO

No presente estudo foi adicionado o extrato oleoso da *Lippia origanoides* no meio de cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro*, com a finalidade de avaliar seu efeito antioxidante. Na etapa de cultivo embrionário, os possíveis zigotos eram cultivados em meios com diferentes concentrações de antioxidantes, sendo um total de 5 tratamentos: **T1** - meio de cultivo sem adição de antioxidantes; **T2** - meio de cultivo + 50µM/mL Cisteamina; **T3** - meio de cultivo + 2,5µg/mL do extrato oleoso de *Lippia origanoides*; **T4** - meio de cultivo + 5,0µg/mL do extrato oleoso de *Lippia origanoides*; **T5** - meio de cultivo + 10,0µg/mL de do extrato oleoso de *Lippia origanoides*. Após o sétimo dia de cultivo (D7), os blastocistos obtidos foram selecionados para as análises. Como resultado das análises realizadas, foram encontrados baixos índices apoptóticos para os embriões cultivados em meios que continham o extrato oleoso de *Lippia origanoides*. Os tratamentos que induziram à menor taxa de apoptose continham maior proporção de mitocôndrias e menor vacuolização citoplasmática, avaliadas por meio da morfometria celular. Além disso, os resultados da expressão gênica indicaram que os tratamentos suplementados com *Lippia origanoides* apresentaram diferenças na expressão da enzima antioxidante PRDX-1, uma importante enzima antioxidante capaz de reduzir o peróxido de hidrogênio. Os resultados obtidos nos diferentes estudos dessa tese sugerem que os compostos presentes no extrato oleoso de *Lippia origanoides* não influenciam diretamente nas taxas de produção total de embriões, porém, podem agir em etapas que incrementam a qualidade das células embrionárias de forma molecular e morfológica.

ABSTRACT

The present work was added to the oily extract of *Lippia organoides* *in vitro* of bovine embryos produced *in vitro*, with an estimated purpose of its antioxidant effect. In the embryonic culture stage, the possible zygotes were cultivated in media with different concentrations of antioxidants, being a total of 5 treatments: **T1** - culture medium without addition of antioxidants; **T2** - culture medium + 50 μ M / mL Cysteamine; **T3** - culture medium + 2.5 μ g / mL of *Lippia organoides* oily extract; **T4** - culture medium + 5.0 μ g / mL of *Lippia organoides* oily extract; **T5** - culture culture + 10.0 μ g / mL oily extract of *Lippia organoides*. After the seventh day of culture (D7), the blastocysts were selected for analysis. As a result of the cultivated analyzes, they were found in the apoptotic indexes for the embryos cultured in media containing the oily extract of *Lippia organoides*. The treatments that induce lower rate of apoptosis are larger in proportion to mitochondria and less cytoplasmic vacuolization, evaluated by means of cellular morphometry. In addition, gene expression results indicated that supplementation tests with *Lippia organoides* were altered in the expression of the antioxidant enzyme PRDX-1, an important antioxidant enzyme capable of reducing the hydrogen content. The results obtained in the different studies were those that were submitted to a non-oil extract test of *Lippia organoides* do not influence the rates of total embryo production, but may act to increase the quality of the embryonic cells in a molecular and morphological way.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
REVISÃO DE LITERATURA	14
1. Produção <i>in vitro</i> de embriões	14
2. Estresse oxidativo e a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)	17
3. Antioxidantes	20
4. <i>Lippia origanoides</i> Kunth	21
5. Expressão Gênica e Morfometria Celular Ultraestrutural na PIVE	22
5. Referências Bibliográficas	24
CAPÍTULO 1	
Antioxidant activity of oily extract obtained from <i>Lippia origanoides</i> improves the quality of bovine embryos produced <i>in vitro</i>	33
Abstract	33
Introduction	33
Material and Methods	34
Results and Discussion	37
Conclusion	43
References	43
CAPÍTULO 2	
Morfometria de blastocistos bovinos produzidos <i>in vitro</i> e cultivados com diferentes concentrações do extrato oleoso de <i>Lippia origanoides</i>	48
Resumo	48
Introdução	49
Material e Métodos	50
Resultados	53
Discussão	56
Conclusão	63
Referências	63
CAPÍTULO 3	
Expressão gênica da enzima antioxidante PRDX-1 de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> em meios de cultivo com extrato oleoso de <i>Lippia origanoides</i>	68
Resumo	68
1.Introdução	69
2.Material e Métodos	70
3.Resultados	73
4.Discussão	75
5.Conclusão	77
Referencias	77
Considerações Finais	81
ANEXO 1	83
ANEXO 2	84
ANEXO 3	85

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1. Rates (mean \pm SD) of expansion, cleavage, blastocyst and total in vitro production of bovine embryos according to the concentration of oily extract of *Lippia origanoides* in embryo culture medium..... 38

Table 2. Number of total embryonic cells, inner cell mass (ICM), ICM:total cells and apoptotic cells in bovine blastocyst (B1) produced in vitro, on the seventh day of culture (D7) in media containing different concentrations of oily extract of *Lippia origanoides*..... 39

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Proporção (%) entre a área total (μm) da célula do Blastocisto (Cel) no sétimo dia de cultivo (D7) em relação à área do núcleo (Nuc), das mitocôndrias (Mit), dos vacúolos (V), dos vacúolos autofágicos (VA) e de gotículas lipídicas (Lip), sem discriminação do tipo celular. Dados foram expressos em médias \pm erro padrão da média..... 54

Tabela 2. Proporção (%) entre a área total (μm) das células (Cel) da Massa Celular Interna (MCI) em relação ao núcleo (Nuc), mitocôndrias (Mit), vacúolos (V), vacúolos autofágicos (VA) e gotículas lipídicas (Lip). Dados foram expressos em médias \pm erro padrão da média..... 54

Tabela 3. Proporção (%) entre a área total (μm) das células (Cel) do Trofoectoderma (TE) em relação ao núcleo (Nuc), mitocôndrias (Mit), vacúolos (V), vacúolos autofágicos (VA) e às gotículas lipídicas (Lip). Dados foram expressos em médias \pm erro padrão da média..... 55

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Quantificação dos embriões realizada com 1 μL do RNAm e do cDNA obtida após a extração e a transcrição reversa para cada tratamento e repetição..... 72

Tabela 2. Sequência de *Primers* para análise da quantidade de transcritos..... 73

Tabela 3. Taxas (médias \pm erro padrão da média) de clivagem e de produção *in vitro* de blastocistos bovinos em meios contendo ou não diferentes concentrações do extrato oleoso de *Lippia origanoides*: T1 - Meio de cultivo *Synthetic Oviduct Fluid* modificado – (SOFm) sem adição de antioxidantes; T2 - SOFm + 50 $\mu\text{M}/\text{mL}$ Cisteamina; T3- SOFm + 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do extrato oleoso de *Lippia origanoides*; T4 - SOFm + 5,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do extrato oleoso de *Lippia origanoides*; e T5 - SOFm + 10,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do extrato oleoso de *Lippia origanoides*..... 74

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Possíveis geradores de EROs na produção *in vitro* de embriões 17

Figura 2. Reações químicas responsáveis pela formação das espécies reativas de oxigênio (EROs) 18

CAPÍTULO 1

Figure 1. Bovine blastocysts produced *in vitro* in culture media without supplementation (A and A'), with supplementation of 50 $\mu\text{M}/\text{mL}$ of cysteamine (B and B'), or with 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (C and C'), 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (D and D'), 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (E and E') of antioxidant obtained from oily extract of *Lippia origanoides*. DAPI-labeled embryonic cells, submitted to the TUNEL test, were visualized by epifluorescence microscopy (blue), and the apoptotic cells were stained by fluorescein (green). Scale bars represent 200 μm 40

CAPÍTULO 2

Figura 1. Blastocisto bovino. Eletromicrografia de células da Massa Celular Interna (MCI) (A e C) e do Trofoectoderma (TE) (B e D) de embriões bovinos produzidos *in vitro* no estágio de blastocisto (Bl)..... 52

Figura 2. Blastocisto bovino. Eletromicrografia dos tipos de mitocôndrias (mit) encontradas nas células da MCI e do TE de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* em diferentes meios de cultivo..... 57

Figura 3. Blastocisto bovino. Eletromicrografia de células do Trofoectoderma (TE) de embriões bovinos produzidos *in vitro*. A) Vacúolos de diversos tamanhos são observados no interior de blastocistos cultivados sem suplementação de antioxidantes (tratamento 1). B) Vacúolos mais escuros presentes em blastocistos cultivados em meio suplementado com 50 $\mu\text{M}/\text{mL}$ do antioxidante Cisteamina (tratamento 2)..... 59

Figura 4. Blastocisto Bovino. Eletromicrografia das células do Trofoectoderma (TE) e da Massa Celular Interna (MCI) de embriões bovinos produzidos *in vitro* contendo vacúolos autofagocitários (va) em vários estágios..... 61

Figura 5. Blastocisto bovino. Eletromicrografia da célula de um embrião bovino produzido *in vitro* no estágio de Blastocisto (Bl) evidenciando a degeneração mitocondrial (mit) por meio do processo de autofagia..... 62

CAPÍTULO 3

Figura 1. Avaliação da abundância dos transcritos para PRDX-1 em blastocistos

bovinos cultivados *in vitro* em tratamentos contendo diferentes concentrações de antioxidante derivado do extrato oleoso da planta *Lippia origanoides*. Valores estão expressos em médias \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$ diferença entre os tratamentos..... 74

ANEXO

Figura 1. Blastocisto bovino. Eletromicrografia de achados microscópicos. As estruturas apontadas pelas setas foram encontradas no espaço entre o Trofoectoderma (TE) e a Zona Pelúcida (ZP). As setas pontilhadas mostram as projeções celulares observadas na blastocele (B) e adjacentes a Massa Celular Interna (MCI)..... 84

Figura 2. Eletromicrografia de células de blastocistos produzidos *in vitro*. Presença de estruturas em forma de bolhas, em várias regiões das células embrionárias. As imagens mostram embriões obtidos no tratamento 1 (A e B), tratamento 2 (C) e tratamento 5 (D)..... 85

Figura 3. Blastocisto bovino. Eletromicrografias de mitocôndrias (mit) apresentando o processo de vacuolização interna. 87

Figura 4. Blastocisto bovino. Eletromicrografia evidenciando o processo de autofagocitose no citoplasma de células embrionárias. 90

Figura 5. Blastocisto bovino. Fotomicrografia de A) mitocôndrias encontradas nos embriões cultivados no Tratamento 3, B) as pertencentes ao Tratamento 4 e C) oriundas do Tratamento 5..... 91

Figura 6. Blastocisto bovino. Eletromicrografia de feixe de filamentos intermediários ou tonofilamentos nas células do Trofoectoderma (TE) do tratamento 4 (A) e 5 (B)..... 92

Figura 7. Blastocisto bovino. Eletromicrografia retratando um possível processo inicial de calcificação das células do embrião bovino cultivados no Tratamento 4..... 93

Figura 8. Blastocisto bovino. Eletromicrografias que apresentam em destaque estruturas que compoe as células de embriões produzidos *in vitro* no estágio de blastocisto..... 93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PIVE – Produção *in vitro* de embriões
MIV – Maturação *in vitro*
FIV – Fertilização *in vitro*
CIV – Cultivo *in vitro*
EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
D7 – Sétimo dia de cultivo
B1 – Blastocisto
MCI – Massa Celular Interna
TE – Trofoectodrema

INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo país com o maior rebanho bovino mundial, apresentando cerca de 215,2 milhões de cabeças. Com isso, é imperativo que o país explore ao máximo seu potencial tanto para a produção de leite como para a pecuária de corte. Em 2016 o país foi o quinto maior produtor mundial, produzindo cerca de 34,6 milhões de toneladas de leite, uma redução estimada de - 1,0% na comparação com o ano anterior (IBGE, 2017). Em relação à produção de carne, o país ainda se iguala a Índia, maior produtora de carne bubalina, como maior exportador mundial (representando 22% de toda a carne bovina exportada) com a possibilidade de alcançar o primeiro lugar nos próximos cinco anos (USDA, 2016).

Pensando então na melhoria da produtividade desses rebanhos, além do uso de um manejo e do monitoramento sanitário adequado, o setor reprodutivo também deve receber atenção especial. Isso porque, a reprodução quando bem assistida ocasiona o ganho genético dos rebanhos bovinos em um menor intervalo de tempo. A fim de criar alternativas que melhorem os índices reprodutivos, surgiram biotecnias reprodutivas como a Inseminação Artificial (IA), a Múltipla Ovulação e Transferência de Embriões (MOET) e a Produção *in vitro* de Embriões (PIVE) (Feugang *et al.*, 2009). Atenção maior deve ser dada a PIVE, pois é capaz de acelerar o ganho genético também por parte das fêmeas, que geram mais descendentes no mesmo intervalo de tempo em comparação com outras biotecnias (Gordon, 2003; Gonçalves e Figueiredo, 2008).

Visando o desenvolvimento pleno do potencial da PIVE, que consiste na obtenção de altas taxas de produções de blastocistos e de embriões de qualidade (Pereira *et al.*, 2005; Medina e Gilbert, 2014), a mesma deve ser realizada em um sistema que mimetize ao máximo o ambiente reprodutivo da fêmea. Para isso foram desenvolvidos protocolos específicos para as etapas de maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV), com critérios particulares a cada etapa (Gordon, 2003).

O conhecimento desses critérios é crucial para um desenvolvimento embrionário satisfatório e para a obtenção de altas taxas de produção de blastocistos ao final da biotecnica. Principalmente em relação aos meios e seus componentes, assim como do ambiente e das estruturas nas quais as células serão cultivadas em cada etapa da PIVE, assim como sua influencia nos processos fisiológicos e bioquímicos celulares (Thomas *et al.*, 2003; Mantikou *et al.*, 2013).

Isso se deve ao fato que a PIVE ocorre em ambiente externo, com as células gaméticas e embrionárias sujeitas a grandes variações do meio. Uma das consequências desta variação é o estresse oxidativo produzido pelo excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs). As células que participam da PIVE contam com a ação protetora antioxidante menos efetiva que a observada no processo natural *in vivo*, e precisam, portanto da suplementação de componentes antioxidantes nos meios de cultivo, e o que é fundamental para que haja uma diminuição da produção exagerada das EROs (Agarwal *et al.*, 2012).

A fim de conseguir mitigar a ação das EROs e seus danos a várias estruturas celulares resultando em apoptose celular, já vem sendo adicionado aos meios de cultivo celular vários tipos de antioxidantes. O objetivo da suplementação com agentes antioxidantes é melhorar o meio e consequentemente a qualidade dos oócitos e embriões cultivados *in vitro*, além de aumentar as taxas de produção de blastocistos e torná-los mais aptos ao processo de criopreservação (Salzano *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2015; Zullo *et al.*, 2016a) .

Entre os antioxidantes que tem sido testados no cultivo embrionário (Wang *et al.*, 2014; Rocha-Frigoni *et al.*, 2016; Rodrigues-Cunha *et al.*, 2016; Takahashi *et al.*, 2016; Zullo *et al.*, 2016b), o extrato oleoso de *Lippia origanoides*, uma espécie arbustiva presente na América Central e do Sul e que tem propriedades terapêuticas (Pascual *et al.*, 2001), demonstrou ter qualidades em sua composição que favorecem a produção *in vitro* de embriões bovinos. A suplementação tanto dos meios de maturação oocitário (Pereira, 2015), como nos meios de cultivo embrionário (Sollecito *et al.*, 2018) produziu resultados positivos que justificam o aprimoramento em pesquisas usando esse composto.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Produção *in vitro* de Embriões (PIVE)

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotecnologia que objetiva o aceleramento do ganho genético tanto pelo macho quanto pela fêmea. Os primeiros relatos da técnica são de 1950 (Chang, 1959) e desde então ela vem sendo continuamente aprimorada. A técnica conta com três etapas principais, conhecidas como: Maturação *in vitro* (MIV), Fertilização *in vitro* (FIV) e Cultivo *in vitro* (CIV) (Choudhary *et al.*, 2016).

A MIV é o processo inicial da produção *in vitro* de embriões na qual os oócitos são aspirados de animais de alto valor genético *in vivo* pela técnica de aspiração folicular guiada por ultrassom (*Ovum pick up* – OPU) ou de ovários retirados de fêmeas após o seu abate (Gordon, 2003). Após a aspiração, o oócito passa por modificações bioquímicas e moleculares objetivando alcançar sua maturação nuclear e citoplasmática, o que o torna capaz então de ser fecundado.

Na maturação oocitária há a retomada da meiose conjuntamente com uma reorganização ultraestrutural das organelas no citoplasma que é regulada pela fosforilação e desfosforilação de diversas proteínas envolvidas no reinício da meiose (De Souza *et al.*, 2004; Dekel, 2005; Dumont *et al.*, 2005). Ainda não se sabe bem qual é o fator que inibe o bloqueio da meiose, mas sabe-se que o AMPc tem ação direta nesta etapa (Conti *et al.*, 2012). Além disso, o gameta feminino armazena material genético de origem materna até que o embrião fecundado tenha condições de ativar seu próprio maquinário genético e então inicie sua própria atividade transcricional (Gandolfi e Gandolfi, 2000).

A próxima etapa conhecida como FIV caracteriza-se pelo encontro e interação entre os dois gametas, designada de fecundação. Esse encontro é caracterizado por um sinergismo entre a parte morfológica, bioquímica e fisiológica que envolve estas células (Salilew-Wondim, 2014). Para isso, após a capacitação do oócito no meio de maturação, os espermatozoides também são selecionados e capacitados para a fecundação.

O primeiro relato bem sucedido de maturação e fertilização *in vitro* se deu em 1986 no Japão quando utilizou-se cálcio ionóforo para a capacitação dos espermatozoides bovinos. Em seguida, um grupo de estudos em reprodução da Irlanda

deu um passo à frente com a transferência não cirúrgica de embriões em receptoras utilizando-se o meio “Tyrode’s albumin lactate and (sodium) pyruvate” (TALP) como meio de fertilização (Lu e Gordon, 1987). Outros meios também surgiram e foram modificados para dar suporte a FIV.

Para que a fertilização *in vitro* obtenha êxito, foram desenvolvidos meios de cultivo e um ambiente favorável, com a atmosfera gasosa e a temperatura ideal tentando mimetizar o ambiente uterino. Os meios mais conhecidos e utilizados são o TALP, o *Synthetic oviduct fluid* - SOF e o Fert-CDM. Além disso, técnicas como *Swim up* e Gradiente Percoll podem ser utilizadas para seleção de espermatozoides baseados em sua motilidade (Parrish *et al.*, 1984; 1995).

A etapa final é a CIV, e inicia-se após a fecundação. Nela ocorre a formação do zigoto que passará por várias divisões que irão segmentar seu citoplasma em pequenos compartimentos ou blastômeros (Watson e Barcroft, 2001). O desenvolvimento embrionário nessa fase caracteriza-se por inúmeras alterações ultraestruturais e moleculares que dão suporte adequado para que o oócito capacitado depois de fecundado evolua até o estágio de blastocisto inicial pré-implantacional. Todo esse processo é altamente coordenado e precisamente regulado. Assim, a evolução do embrião se dá de forma sincronizada e perfeita, levando ao resultado final que é a formação de um produto saudável e fisiologicamente apto a reprodução (Sun *et al.*, 2015).

Em bovinos, o processo tem duração de sete dias, quando a partir desse dia o embrião pode ser transferido para uma receptora previamente submetida a um protocolo hormonal, no qual terminará seu desenvolvimento *in vivo* ou então poderá ser criopreservado para posterior transferência. O período de cultivo varia entre as espécies, e por ocorrer *in vitro*, a preocupação primordial está ligada em oferecer ao oócito e ao embrião, todo o aparato necessário para seu pleno desenvolvimento (Rizos *et al.*, 2003; Gonçalves e Figueiredo, 2008).

A biotecnia da PIVE iniciou com meios que ofereciam poucas condições tanto para o desenvolvimento oocitário como embrionário. O primeiro sistema de cultivo utilizado para a produção *in vitro* de embriões foi o sistema definido, que consiste na utilização durante todo o período de cultivo de um meio com a mesma constituição, sem variações (Summers e Biggers, 2003). Sua base é definida, daí o seu nome. Durante a década de 1990 houve um aumento do conhecimento sobre o ambiente reprodutivo da fêmea com uma melhor compreensão dos requerimentos de substratos energéticos e

como um meio que atende essa alteração beneficia mais o desenvolvimento embrionário que um meio definido (Gordon, 2003).

Mesmo com todos os avanços na PIVE, os meios definidos ainda não conseguem reproduzir com perfeição o ambiente reprodutivo *in vivo*, que possui certa dinâmica e complexidade. Além disso, existe a plasticidade de gametas e de embriões em estágio de pré-implantação, com o desenvolvimento aceitável relatado para uma ampla variedade de condições de cultura. Assim, oportunidades que auxiliem em definir melhores sistemas de cultura que correspondam de forma mais fiel as interações físicas e químicas entre gametas e embriões com os diversos microambientes apresentados pelo trato reprodutivo feminino, é o ideal (Medina e Gilbert, 2014). Surgem assim os meios sequenciais.

Os sistemas sequenciais contam com a alteração dos meios durante o cultivo, a fim de beneficiar os embriões que neste momento passam por sucessivas mudanças. Os aspectos de utilização de certos nutrientes são semelhantes entre espécies, principalmente no que se refere ao baixo consumo de glicose e ao efeito benéfico dos aminoácidos não essenciais e da glutamina antes da compactação (Lane e Gardner, 2007).

Dentro de cada sistema de cultivo existem componentes que fazem parte da constituição de meios que são utilizados em cada etapa da PIVE. Há também elementos que são específicos de cada fase, assim como os que são comuns em todas as etapas. Com o passar dos anos diversos grupos científicos se empenharam em produzir tipos de meios variados, assim como diversos tipos de sistemas de cultivo (Lane e Gardner, 2007). A evolução da técnica concomitante ao avanço do conhecimento dos eventos fisiológicos e bioquímicos das células gaméticas tem proporcionado a PIVE inúmeras possibilidades de formas de cultivo (Gordon, 2003).

Com essa evolução, a PIVE se tornou uma das alternativas disponíveis no Brasil para incrementar e acelerar o ganho genético que tem como resultado o progresso do rebanho nacional. Os resultados positivos impulsionam as pesquisas nessa área, que está sempre em constante desenvolvimento objetivando o aumento da produção e a melhoria da qualidade do embrião produzido (Viana *et al.*, 2017).

2. Estresse oxidativo e a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Como é do conhecimento comum, na evolução natural dos seres vivos para indivíduos mais complexos, o metabolismo energético também progrediu, passando de anaeróbico para aeróbico. Com o início da utilização do oxigênio (O_2) o metabolismo energético possibilitou o desenvolvimento de formas mais organizadas de vida. Destas reações surgiram as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).

As EROs são produzidas naturalmente pelo metabolismo celular aeróbico mesmo em condições basais (Guérin *et al.*, 2001; Martelli e Nunes, 2014). Quando em equilíbrio, são importantes sinalizadores de processos fisiológicos como a regeneração tecidual, regulação redox intracelular, embriogênese, esteroidogênese e sinalização hormonal, estando presente em todos os tipos de células (Agarwal *et al.*, 2008). Controlam a intensidade e duração da sinalização celular, por meio de processos cíclicos de oxidação/ redução em proteínas-chave como quinases, fosfatases e fatores de transcrição (Martelli e Nunes, 2014). A PIVE gera as EROs através do metabolismo do próprio embrião ou por uma serie de fatores ligadas ao meio de cultivo que são responsáveis por aumentar as concentrações desses radicais livres (Guérin *et al.*, 2001; De Matos *et al.*, 2002) (Figura 1).

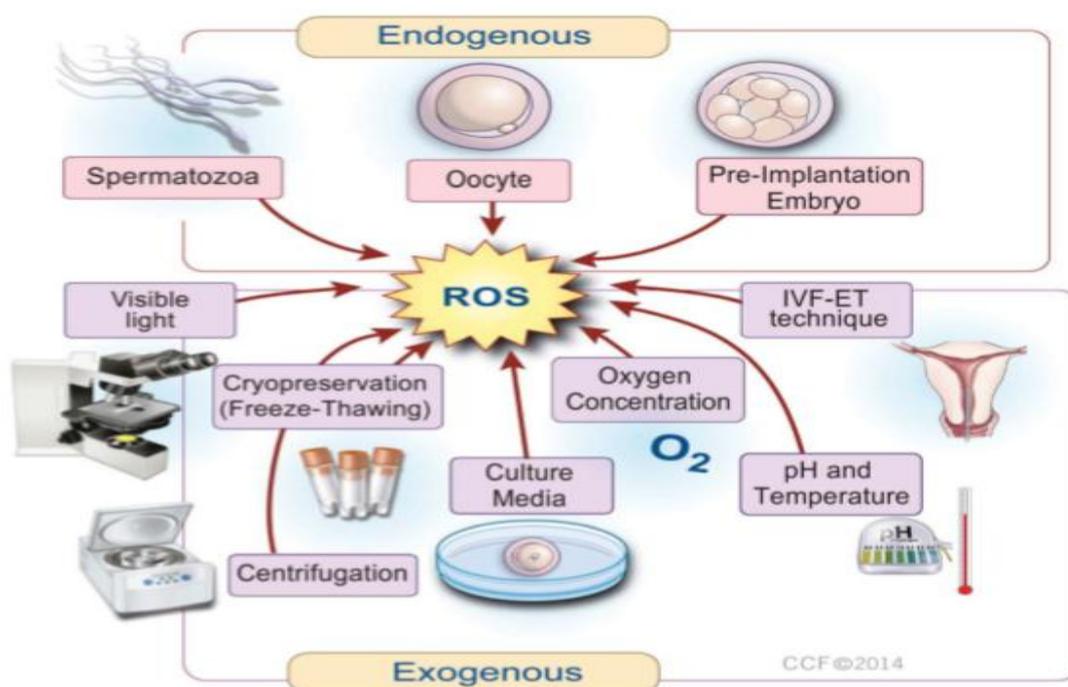


Figura 1. Possíveis geradores de EROs na produção *in vitro* de embriões. Fonte: Agarwal *et al.*, 2014.

Estas espécies reativas são formadas a partir da redução do O₂ por meio de diversas vias metabólicas e enzimáticas, sendo a fosforilação oxidativa a principal via utilizada e tendo as mitocôndrias como as principais fontes endógenas de EROs (Ferreira e Matsuraba, 1997; Agarwal *et al.*, 2014; Martelli e Nunes, 2014) (Figura 2).

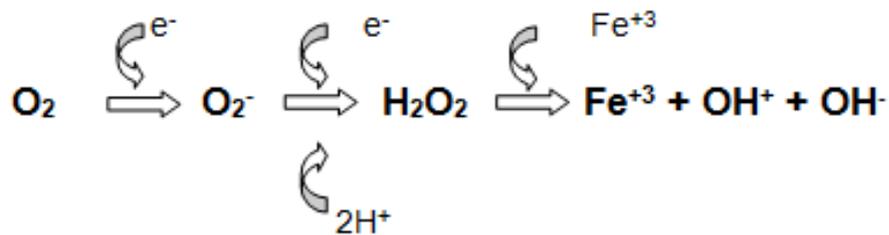


Figura 2. Reações químicas responsáveis pela formação das espécies reativas de oxigênio (EROs). Adaptado de Ferreira e Matsuraba (1997).

Durante essas reações, o O₂ torna-se altamente reativo, por ocorrer um não-emparelhamento de elétrons da sua última camada eletrônica, o que confere alta reatividade a essa molécula (Martelli e Nunes, 2014). Após a primeira redução do O₂, é formado o radical livre superóxido (O₂⁻), ficando instável e causando reações adversas. Se este radical receber mais um elétron e dois íons de hidrogênio, ocorrerá a formação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Por sua vez, se houver reação deste peróxido de hidrogênio com íons de ferro ou cobre ocorrerá a formação do radical hidroxila (OH⁻), considerado o mais reativo das EROs (Ferreira e Matsuraba, 1997).

Em decorrência da perda de elétrons em suas camadas de valência, o O₂ que antes era estável, perde sua consistência e passa a causar danos celulares. Estes tipos de compostos tem elevada afinidade por estruturas de natureza lipídica, principalmente pelos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares. Sendo assim, com a formação das EROs, estas membranas são as mais afetadas por possuírem alto teor de ácido graxos poliinsaturados em sua composição. Como consequência, tem-se alteração da permeabilidade com modificação de sua seletividade iônica, possibilitando a entrada e saída de nutrientes e substâncias tóxicas do citoplasma. Outro resultado da oxidação

lipídica de membranas celulares é a mudança nas funções das organelas intracitoplasmáticas com a liberação de seu conteúdo, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído) culminando com a morte celular (Ferreira e Maturaba, 1997; Crocomo *et al.*, 2012).

Os danos causados pelas EROs se iniciam nas membranas celulares e são resultado da reação denominada Lipoperoxidação que ocorre em cadeia, e tem característica irreversível (Lima e Abdalla, 2001). Esta reação é representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação e resultam na instabilidade das membranas, com perda principalmente de sua seletividade.

A membrana nuclear também é comprometida, e após a perda de sua funcionalidade, as EROs adentram no núcleo celular. Isso ocasionará modificações no nucléolo, que vão desde a deficiência de histonas, alterando a capacidade de se manterem em sua forma natural e impedindo a condensação plena do material genético, até danos diretos nas cadeias de DNA, provocando alteração na codificação genética. Como o meio de cultivo *in vitro* de embriões produz elevada quantidade de EROs, os padrões epigenéticos muitas vezes não são alcançados (Li *et al.*, 2005; McEwen *et al.*, 2013; Gaspar *et al.*, 2015).

As EROs podem oxidar as bases de DNA e componentes das vias de sinalização ou, ainda, mudar a expressão gênica atacando e modificando a atividade dos fatores de transcrição, ou gerando processos mutagênicos ou tumorais (Svilar *et al.*, 2010). Devido a estas alterações, o embrião tem seu desenvolvimento bloqueado já que é necessária a utilização do material genético para a transcrição de moléculas importantes a sua sobrevivência (Svilar *et al.*, 2010; McEwen *et al.*, 2013; Gaspar *et al.*, 2015).

Tanto os danos causados nas membranas celulares como no núcleo, geram sinalizadores para que ocorra a apoptose celular. As células de blastocistos sofrem apoptose, principalmente pelo acúmulo de radicais do tipo H₂O₂, isso porque, nesse estágio o embrião apresenta uma redução da enzima Superóxido dismutase (SOD), responsável pela redução deste peróxido (Pierce *et al.*, 1991). A principal característica encontrada nesses embriões é o aparecimento de fragmentos citoplasmáticos, que geralmente ocorrem antes do bloqueio do desenvolvimento embrionário, que irá resultar na morte do mesmo. Acredita-se que essa fragmentação seja um mecanismo para regular a relação núcleo:citoplasma em blastocistos e/ou um mecanismo de defesa contra os danos induzidos pelo estresse oxidativo (Yang e Rajamahendran, 1999; Guérin *et al.*, 2001).

Embora as EROs sejam relacionadas na maioria das vezes com efeitos deletérios ao organismos, as mesmas são conhecidas também por serem mediadoras das respostas inflamatórias. Seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido aracdônico (para formação de prostaglandinas) (Ross e Moldeus, 1991). Também agem na defesa contra a infecção, quando bactérias estimulam os neutrófilos a produzirem espécies reativas com a finalidade de destruírem o microorganismo invasor (Magder, 2006). Além disso, os radicais livres e demais espécies reativas são fundamentais para a homeostase celular e o funcionamento adequado dos organismos vivos. Outra fonte de radicais livres no organismo são as células do sistema imunológico, produtoras de enzimas NADPH Oxidase (Nox) que geram uma grande quantidade de O_2^- capaz de eliminar microrganismos nocivos (Martelli e Nunes, 2014; Lamberth e Neish, 2014).

3. Antioxidantes

Vários mecanismos de defesa estão presentes tanto no embrião como no ambiente que o cerca, agindo no reparo de ações lesivas das EROs. *In vivo*, oócitos e embriões parecem ser protegidos contra o dano oxidativo por meio de sequestradores de oxigênio presentes no líquido folicular e no fluido da tuba uterina, chamados de antioxidantes (Lapointe e Bilodeau, 2003; Agarwal *et al.*, 2014).

Os antioxidantes são definidos como “qualquer substância capaz de em baixas concentrações, comparada com o substrato oxidável, promover a retirada ou impedir que haja a produção desse substrato” (Halliwell e Gutteridge, 1999). Suas ações são as mais diversas e são classificadas em dois tipos: os antioxidantes enzimáticos e os não enzimáticos.

Os antioxidantes enzimáticos, possuem a função de transformar as EROs em substâncias menos nocivas às células, numa ação de neutralização. As principais enzimas ligadas à limpeza destes oxidantes são a Superóxido Dismutase (SOD), a Catalase (CAT), as Peroxirredoxinas (PRDXs) e o sistema Glutathiona redutase/ Glutathiona Peroxidase (GPx) (Crocomo *et al.*, 2012). Cada uma age em EROs distintas. O produto final da redução de todos os oxidantes será a água (H_2O) e outro composto que depende da EROs inicial.

Os antioxidantes não enzimáticos são conhecidos por serem obtidos através da dieta, por terem baixo peso molecular e realizarem a limpeza dos agentes oxidantes sem ser por meio de reações mediadas por eles.

Os mais conhecidos e atuantes são a vitamina A, vitamina E (Tocoferol), Vitamina C (ácido ascórbico) e o Piruvato. Compostos a base de enxofre também são importantes, sendo eles: a Taurina, a Hipotaurina e a Glutationa. E dentre os compostos tióis estão: Cistina, cisteína, cisteamina e beta-mercaptoetanol usados principalmente em meios de cultivo oocitário e embrionário *in vitro* (De Matos *et al.*, 2002).

4. *Lippia origanoides*

Atualmente, existem várias opções de antioxidantes possíveis de serem testados e avaliados no meio de cultivo celular. Entre os antioxidantes de origem vegetal está o extrato oleoso de *Lippia origanoides* (Vela e Sanchez, 2012). A *Lippia origanoides* é uma espécie arbustiva, com distribuição geográfica na América Central e América Latina. No Brasil é encontrada na região norte, onde é conhecida popularmente como “Salva de Marajó” ou “Alecrim d’Angola” (da Silva *et al.*, 2017). Em estudos comparativos entre espécies da mesma família *Verbenaceae*, a *Lippia origanoides* foi a planta que produziu o óleo com maior atividade antioxidante, menor índice de toxicidade celular e foi a única com efeitos bacteriostáticos em *Escherichia Coli*, *Salmonella tiphmuriium* e *Staphlococcu aureus* (Celis *et al.*, 2007). São conhecidas também por suas propriedades antiparasitárias, antihelmíntica, antiprotozoárias, sedativa, calmante e anti-cancerígena (Soares e Tavares-Dias, 2013).

O potencial dos princípios bioativos obtido do extrato oleoso da *Lippia origanoides*, conjuntamente a sua composição rica em timol e carvacrol, favorecem o uso deste componente também como um fator favorável em meios de cultivo embrionário por inibirem a formação de estruturas hexanais obtidas da oxidação lipídica e que por consequência danificam principalmente as membranas celulares. Além disso, estes compostos protegem os ácidos nucleicos das células de possíveis injúrias (Vicuña *et al.* 2010). Em estudo realizado por Pereira (2015), utilizou-se as concentrações de 2,5µg/mL, 5µg/mL e 10µg/mL do extrato oleoso de *Lippia origanoides*, suplementado no meio de maturação oocitária na PIVE de bovinos e bubalinos. Os resultados

demonstraram que não houve diferença na taxa de blastocistos entre os tratamentos ($P > 0,05$) para a espécie bovina. Já em relação aos bubalinos, obteve-se aumento das taxas de blastocistos nos oócitos maturados com $2,5\mu\text{g/mL}$ do extrato oleoso de *Lippia origanoides* ($P < 0,05$).

Com base na literatura, o uso de antioxidantes nos meios de cultivo oocitário e embrionário têm sido cada vez mais difundidos por favorecer o desenvolvimento e a qualidade celular. Sendo assim, a todo momento surgem compostos que podem exercer esse papel, como o extrato oleoso da *Lippia origanoides*. Esse extrato possui em sua composição, uma maior porcentagem de monoterpenóides como o Timol e Carvacrol (aproximadamente 90,2%), substâncias responsáveis pela captação de EROs (da Silva *et al.*, 2017). A porcentagem de cada composto presente nesse óleo pode oscilar dependendo da localização da coleta da planta, das partes do vegetal utilizadas para sua extração e da estação do ano na qual foi realizada, o que dificulta estipular um padrão fixo de sua composição química.

Apesar dessa variação, a adição do extrato oleoso da *Lippia origanoides* em trabalhos preliminares, tem mostrado resultados promissores, o que justificaria sua suplementação nos meios da PIVE.

5. Expressão Gênica e Morfometria Celular Ultraestrutural na PIVE

Na biotecnia da produção *in vitro* de embriões (PIVE) são coletados alguns dados que irão fornecer informações sobre seu desempenho em cada fase do processo. Entre os parâmetros utilizados para espécie bovina, estão as taxas de expansão (80-90%), de clivagem (60-70%) e de blastocistos (35-45%) (Gordon, 2003). Entretanto, são dados subjetivos obtidos de forma não invasiva e que são correlacionados positivamente com a maturação oocitária, o desenvolvimento embrionário e o sucesso na transferência de embriões, respectivamente, mas que não demonstram com detalhes características intrínsecas dessas células.

Os embriões produzidos *in vitro* apresentam uma série de diferenças em relação aos produzidos *in vivo* (Pomar *et al.*, 2005), principalmente em relação a sua qualidade (Pereira *et al.*, 2005) que é consequência das condições de cultivo oocitário e embrionário (Rizos *et al.*, 2008). Com a finalidade de aprofundar a compreensão sobre

o efeito da produção *in vitro* nos embriões, avaliações morfológicas, metabólicas e na expressão gênica dos mesmos foram desenvolvidas e hoje tem ampla utilização.

Entre as possíveis técnicas moleculares, a que tem grande aplicação no meio científico e que tem auxiliado na melhoria dos meios de cultivo a fim de favorecer embriões de melhor qualidade, é a análise de expressão gênica de oócitos e embriões. Ao estudar de forma minuciosa o papel dos genes no desenvolvimento embrionário, Niemann e Wrenzycki (2000), concluíram que a PIVE pode ter efeitos profundos na atividade genômica em embriões na fase de pré-implantação com ações potenciais em sua viabilidade fetal, pré-natal e pós-natal.

Atualmente, a Reação em Cadeia da Polimerase ou *Polymerase Chain Reaction* – PCR é um dos métodos de mensurar a expressão gênica mais conhecidos e confiáveis que fazem parte da rotina laboratorial. A PCR é capaz de amplificar uma ou poucas cópias de DNA em várias outras, gerando milhares a milhões de cópias de uma determinada sequência de DNA (Ladeira *et al.*, 2011).

Além da PCR convencional, existe a reação em tempo real (PCR-RT) que trouxe grandes avanços na quantificação da expressão gênica. A PCR-RT é uma coleção de sinais fluorescentes de uma ou mais reações da cadeia polimerase após uma sucessão de ciclos. A quantificação ocorre quando se converte os sinais fluorescentes em um valor numérico para cada amostra (Dorak, 2006).

Vários são os genes que podem ser utilizados como alvos a serem avaliados dependendo da linha e do objetivo da pesquisa. Alguns são mais conhecidos por suas funções estruturais e são chamados de genes endógenos, estando sempre presentes em qualquer célula, funcionando como o controle para a PCR. A importância desta técnica reside no fato de que o ambiente de cultivo da PIVE afeta a expressão de vários genes se tornando um potencial marcador da qualidade embrionária (Cordova *et al.*, 2014).

Outra análise que é possível ser feita com a finalidade de avaliar a qualidade celular é a Morfometria Celular Ultraestrutural, através de micrografias em microscópio eletrônico de transmissão. Esta técnica é realizada através da contagem e mensuração da célula e das organelas contidas em seu interior.

Para prever a qualidade embrionária, alguns trabalhos utilizaram principalmente como parâmetro a avaliação de mitocôndrias, vacúolos e vacúolos autofágicos (Crosier *et al.*, 2001; Maddox-Hyttel *et al.*, 2003; Kubovicová *et al.*, 2008). Os resultados destes estudos evidenciam que a forma e o comportamento das organelas, mostram como está a sua saúde celular.

Tanto nos oócitos como nos embriões, as mitocôndrias são organelas fundamentais. Elas são as grandes geradoras de energia promovendo e garantindo o sucesso celular (Wilding *et al.*, 2009). Além disso, estão intimamente ligadas a formação do fuso mitótico e na divisão celular. Por isso, a quantidade dessas organelas nos campos da microscopia eletrônica, determina a funcionalidade celular (Bavister e Squirrel, 2000). Junto com a morfometria, a configuração relacionada a distribuição das cristas intramitocondriais revelam se houve aumento na frequência de mutações e deleções que resultam em atividade mitocondrial inadequada influenciando o desenvolvimento embrionário (Chappel, 2013).

Na morfometria, os vacúolos também são organelas de escolha para designar a qualidade celular. Quando em maior quantidade, os vacúolos demonstram uma alteração celular, com a tentativa de debelar alguma injúria e equilibrar o ambiente intracelular (Ghadially, 1988). Quando os vacúolos se unem e formam vacúolos gigantes, os mesmos interferem no fuso de divisão celular, impedindo a clivagem embrionária (Wallbutton e Kasraic, 2010). Além disso, vacúolos autofágicos, uma derivação dos vacúolos, são produzidos para manter a homeostase celular e eliminar organelas velhas e sem função do seu interior (Shin *et al.*, 2014).

Assim, a técnica de morfometria ultraestrutural pode ser uma opção de ferramenta para a seleção de meios e sistemas de cultivo *in vitro*, já que revela em detalhes como se comportam as organelas das células embrionárias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AGARWAL, A.; DURAIRAJANAYAGAM, D.; DU PLESSIS, S. S. Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, v.12, p.112, 2014.

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SEKHON, L.; et al. Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid. Redox Signal.*, v.10, p.1375-1403, 2008.

AGARWAL, A.; APPONTE-MELLADO, A.; PREMKUMAR, B. L.; et al. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, p.10-49, 2012.

BAVISTER, B. D.; SQUIRRELL, J. M. Mitochondrial distribution and function in oocytes and early embryos. *Hum. Reprod.*, v. 15, n.2, p.189-198, 2000.

CHAPPEL, S. The role of mitochondria from mature oocyte to viable blastocyst. *Obstet. Gynecol. Int.*, p.10, 2013.

CELIS, C. N.; RIVERO, P. E.; ISAZA, J. H. Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippia organoides* y *phyla dulcis*, especies de la familia verbenacea. *Scientia et Technica* Año XIII, n.33, p.103-105, 2007.

CHOUDHARY, K. K.; KAVYA, K. M.; JEROME, A.; et al. Advances in reproductive biotechnologies. *Vet. World*, v.9, p.388-395, 2016.

CONTI, M.; HSIEH, M.; ZAMAH, A. M.; et al. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Molecular Cell Endocrinology*, p. 356-6573, 2012.

CORDOVA, A.; PERREAU, C.; UZBEKOVA, S.; et al. Development rate and gene expression of IVP bovine embryos cocultured with bovine oviduct epithelial cells at early or late stage of preimplantation development. *Theriogenology*, v.81, p. 1163-1173, 2014.

CROCOMO, L. F.; MARQUES FILHO, W. C.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; et al. Produção de embriões *in vitro*: estresse oxidativo e antioxidantes. *Veterinária e Zootecnia*, v.19 (supl. 4), p.470-479, 2012.

CROSIER, A. E.; FARIN, P. W.; DYKSTRA, M. J.; et al. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced *in vivo* or *in vitro*. *Biol. Reprod.*, v.64, p.1375–1385, 2001.

DA SILVA, A. P.; SILVA, N. F.; ANDRADE, E. H. A.; et al. Tyrosinase inhibitory activity, molecular docking studies and antioxidant potential of chemotypes of *Lippia organoides* (Verbenaceae) essential oils. *PLoS ONE*, v.12, n.5, p.1-17, 2017.

DE MATOS, D. G.; GASPARRINI, B.; PASQUALINI, S. R.; et al. Effect of glutathione stimulation during *in vitro* maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology*, v.57, p.1443-1451, 2002.

DE SOUSA, P. A.; SILVA, S. J. M.; ANDERSON, R. A. Neurotrophin signaling in oocyte survival and developmental competence: A paradigm for cellular totipotency. *Cloning Stem Cells*, v.6, p.375-385, 2004.

DEKEL, N. Cellular Biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. *Molecular Cell Endocrinology*, v.234, p.19-25, 2005.

DORAK, M. T. Real-time PCR. Print edition. First Edition, New York, 2006.

DUMONT, J.; UMBHAUER, M.; RASSINIER, P.; et al. p90Rsk is not involved in cytotstatic factor arrest in mouse oocytes. *Journal of Cell Biology*, v.169, p.227-231, 2005.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v.43 (supl.1), p.61-68, 1997.

FEUGANG, J. M.; CAMARGO-RODRIGUEZ, O.; MEMILI, E. Culture systems for bovine embryos. *Livest. Sci.*, v.121, p.141-149, 2009.

GHADIALLY, F. N. Ultrastructural Morphology of the cell and matrix. Third Edition, Volume 2. Butterworths, London. 1988.

GANDOLFI, T. A. L. B.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology*, v.55, p.1255-1276, 2000.

GASPAR, R. C.; ARNOLD, D. R.; CORREA, C. A. P.; et al. Oxygen tension affects histone remodeling of in vitro-produced embryos in bovine model. *Theriogenology*, v.83, p.1408-1415, 2015.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. Biotecnologias aplicadas à Reprodução Animal. 2ª edição, Selo editorial: Roca, 2008.

GORDON, L. Laboratory Production of Cattle Embryos. 2ª Edition, Cabi Publishing, 2003.

GUÉRIN, P.; EL 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, p.175-189, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radical in biology and medicine. 3^a ed. New York: Oxford Science Press; 1999.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acessado em: 23/04/2016.

LADEIRA, P. R. S.; ISAAC, C.; FERREIRA M. C. Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real. *Rev. Med. (São Paulo)*, v.90(1), p.47-51, 2011.

LANE, M.; GARDNER, D. K. Embryo culture medium: wich is the best? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.*, v.21, n.1, p.83-100, 2007.

LAMBETH, J. D.; NEISH, A. S. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. *Annu. Rev. Pathol. Mech.*, v.9, p.119. 2014.

LAPOINTE, J.; BILODEAU, J. F. Antioxidant defenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle. *Biol. Reprod.*, v.68, p.1157-1164, 2003.

LI, G. P.; LIU, Y.; BUNCH, T. D.; et al. Asymmetric division of spindle microtubules and microfilaments during bovine meiosis from metaphase II to metaphase III. *Mol. Reprod. Dev.*, v.71, p.220-226, 2005.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v.37, p.293-303, 2001.

LU, K. H.; GORDON, I. Effect of pH on capacitation and fertilization medium on the in vitro fertilization of bovine oocytes. *Proceedings of the Society for Study of Fertility*, York, Abstract, p. 77, 1987.

KUBOVICOVA, E.; MAKAVERICH, A. V.; PIVKO, P.; et al. Alteration in ultrastructural morphology of bovine embryos following subzonal microinjection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV). *Zygote*, v.16, p. 187–193, 2008.

- MADDOX-HYTTEL, P.; ALEXOPOULOS, N. I.; VAJTA, G.; et al. Immunohistochemical and ultrastructural characterization of the initial post-hatching development of bovine embryos. *Reproduction*, v.125, p.607-623, 2003.
- MAGDER, S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? *Crit. Care*, v.10, p.208. 2006.
- MANTIKOU, E.; YOUSSEF, M. A. F. M.; VAN WELY, M.; et al. Embryo culture media and IVF/ICSI success rates: a systematic review. *Hum. Reprod. Update*, Vol.19, No.3 pp. 210–220, 2013.
- MARTELLI, F.; NUNES, F. M. F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. *Ciência e Cultura*, v.66, n.3, p. 54-57, 2014.
- McEWEN, K. R.; LEITCH, H. G.; AMOUROUX, R.; et al. The impact of culture on epigenetic properties of pluripotent stem cells and preimplantation embryos. *Biochem. Soc. Trans.*, v.41, p. 711-719, 2013.
- MEDINA, V. A. A.; BUTLER, W. R.; GILBERT, R. O. Preimplantation embryo metabolism and culture systems: experience from domestic animals and clinical implications. *J. Assist. Reprod. Genet.*, v.31, p.393–409, 2014.
- NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology*, v.53, p. 21034, 2000.
- 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, p.859–869, 1995.
- PARRISH, J. J.; PARRISH, J. L.; FIRST, N. L. Effect of swim-up separation and heparin pretreatment of frozen-thawed spermatozoa on in vitro fertilization of bovine oocytes. *Biology of Reproduction*, v.30 (suppl. 1), p.112, 1984.
- PASCUAL, M. E.; SLOWING, K., CARRETERO, E. et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *J. Ethnopharmacol.*, v.76, p.201-214, 2001.
- PEREIRA, D. C.; DODE, M. A. N.; RUMPF, R. Evaluation of different culture systems on the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*, v.63, p.1131-1141, 2005.

PEREIRA E C M. Produção de oócitos e embriões bubalinos: efeitos da época do ano e da adição de óleo essencial de *Lippia origanoides* na maturação *in vitro*. 2015. 128f. Tese de Doutorado Biotecnologia Animal da FMVZ – UNESP – Botucatu.

PIERCE, G. B.; PARCHMENT, R. E.; LEWELLYN, A. L. Hydrogen peroxide as a mediator of programmed cell death in the blastocyst. *Differentiation*, v.46, p.181-186, 1991.

POMAR, F. J. R.; TEERDS, K. J.; KIDSON, A. *et al.* Differences in the incidence of apoptosis between *in vivo* and *in vitro* produced blastocysts of farm animal species: a comparative study. *Theriogenology*, v.63, p.2254-2268, 2005.

RIZOS, D.; GUTIERREZ, A.; PEREZ, G.; *et al.* Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol. Reprod.*, v.68, p.236–243, 2003.

ROCHA-FRIGONI, N. A. S.; LEÃO, B. C. S.; DALL’AQUA, L. C.; *et al.* Improving the cytoplasmic maturation of bovine oocytes matured *in vitro* with intracellular and/or extracellular antioxidants is not associated with increased rates of embryo development, *Theriogenology*, v.86, p.1897-1905, 2016.

RODRIGUES-CUNHA, M. C.; MESQUITA, L. G.; BRESSAN, F. *et al.* Effects of melatonin during IVM in defined medium on oocyte meiosis, oxidative stress, and subsequent embryo development. *Theriogenology*, v.86, p.1685-1694, 2016.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In Vigo-Pelfrey C (ed): Membrane lipid oxidation. 1th ed. Boca Raton, CRC Press, p.151-170, 1991.

SALILEW-WONDIM, D.; TESFAYE, D.; HOELKER, M.; *et al.* Embryo Transcriptome response to environmental factors: Implication for its survival under suboptimal conditions. *Animal Reproduction Science*, v.149, p. 30-38, 2014.

SALZANO, A.; ALBERTO, G.; ZULLO, G. *et al.* Effect of resveratrol supplementation during culture on the quality and cryotolerance of bovine *in vitro* produced embryos. *Anim. Reprod. Sci.*, v.151, p.91-96, 2014.

SHIN, H.; CHOI, S.; LIM, H. J. Relationship between reactive oxygen species and autophagy in dormant mouse blastocysts during delayed implantation. *Clin. Exp. Reprod. Med.*, v.41, n.3, p.125-131, 2014.

SOARES, B. V.; TAVARES-DIAS, M. Espécies de *Lippia* (*Verbenaceae*), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. *Biota Amazônia*, v.3, n.1, p.109-123, 2013.

SOLLECITO, N. V.; PEREIRA, E. C. M.; GRAZIA, J. G. V. et al. Antioxidant activity of essential oil obtained from *Lippia origanoides* improves the quality of bovine embryos produced *in vitro* 2018 (*in press*).

SUMMERS, M. C.; BIGGERS, J. D. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. *Human Reproduction Update*, v.9, N.6, p.557-582, 2003.

SUN, W-J.; PANG, Y-W.; LIU, Y. et al. Exogenous glutathione supplementation in culture medium improves the bovine embryo development after *in vitro* fertilization. *Theriogenology*, v.84, p.716-723, 2015.

SVILAR, D.; GOELLNER, E. M.; ALMEIDA, K. H.; et al. Base excision repair and lesion-dependent sub pathways for repair of oxidative DNA damage. *Antioxid. Redox Signal.*, v.14, p.2491. 2010.

TAKAHASHI, T.; SASAKI, K.; SOMFAI, T. et al. N,N-Dimethylglycine decreases oxidative stress and improves *in vitro* development of bovine embryos. *J. Reprod. Dev.*, v.62, p.209-212, 2016.

THOMAS, F. H.; WALTERS, K. A.; TELFER, E. E. How to make a good oocyte: an update on in-vitro models to study follicle regulation. *Hum. Reprod. Update*, v.9, n.6 p.541-555, 2003.

USDA. United States Department of Agriculture - Disponível em: https://www.nass.usda.gov/Publications/Ag_Statistics/2016/index.php - > Acessado em [22/01/2018](#).

- VELA, N. E. V.; SÁNCHEZ, M. I. C. Genetic structure along an altitudinal gradient in *Lippia origanoides*, a promising aromatic plant species restricted to semiarid areas in northern South America. *Ecol. E.*, v.2 (supl. 11), p.2669-2681, 2012.
- VIANA, J. H. M.; FIGUEIREDO, A. C. S.; SIQUEIRA, L. G. B. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. *Anim. Reprod.*, v.14 (supl. 3), p.476-81, 2017.
- VICUNÃ,G. C.; STASHENKO, E. E.; FUENTES, J. L. Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. *Fitoterapia*, v.81, p.343–349, 2010.
- ZULLO, G.; ALBERO, G.; NEGLIA, G. et al. L-ergothioneine supplementation during culture improves quality of bovine in vitro-produced embryos. *Theriogenology*, v.85, p.688-697, 2016a.
- ZULLO, G.; De GANDITIIS, C.; PERO, M. E. et al. Crocetin improves the quality of *in vitro*-produced bovine embryos: Implications for blastocyst development, cryotolerance, and apoptosis. *Theriogenology*, v.86, p.1879-1885, 2016b.
- YANG, M. Y.; RAJAMAHENDRAN, R. Apoptosis in bovine oocytes and in preimplantation embryos: the role of Bcl-2 and Bax genes. *Biol. Reprod.*, v.60 (supl.1), p.190 (abstract), 1999.
- WANG, F.; TIAN, X. Z.; ZHANG L. et al. Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after *in vitro* fertilization. *Reprod. Sci.*, v.101, n.2, p.577-586, 2014.
- WATSON, A. J.; BARCROF, I. C. Regulation of blastocyst formation. *Frontiers in Bioscience*, v.6, p.708-730, 2001.
- WILDING, M.; COPPOLA, G.; DALE, B.; et al. Mitochondria and human preimplantation embryo development. *Reproduction*,; v.137, p.619-624, 2009.

CAPÍTULO 1

Trabalho aceito na revista “Arquivo Brasileiro de Zootecnia e Medicina Veterinária”

Antioxidant activity of oily extract obtained from *Lippia origanoides* improves the quality of bovine embryos produced *in vitro*

Antioxidant activity of oily extract obtained from *Lippia origanoides* improves the quality of bovine embryos produced *in vitro*

N.V.Sollecito¹, E. C. M. Pereira², J. G. V. de Grázia¹, B. N. Parzewski¹, B. V. R. Couto³, V. B. Andrade³, M. S. Miranda⁴, J. K. R. Da Silva⁴, A. M. Borges⁵

¹ Pos graduation student, Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, MG

² Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlândia, MG

³ Graduation student, Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, MG

⁴ Faculdade de Biotecnologia, Universidade Federal do Pará

⁵ Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the supplementation of embryo culture medium with antioxidant obtained from oily extract of *Lippia origanoides* on *in vitro* blastocyst development and quality. Oocytes collected from slaughterhouse ovaries were matured and fertilized *in vitro* following standard laboratory procedures. Zygotes were cultured in SOF medium supplemented according to the following treatments: T1 embryo culture medium without antioxidant supplementation; T2)50µM/mL Cysteamine; T3)2.5µg/mL; T4)5.0µg/mL and T5)10.0µg/mL of antioxidant obtained from oily extract of *Lippia origanoides*. On the seventh day of culture, the blastocysts were fixed and evaluated for apoptosis rates, number of total cell and inner cell mass cells by means of the TUNEL Test. The use of antioxidants during cultivation did not increase ($P>0.05$) the final blastocyst production rate. The treatments T2, T3, T4 and T5 had the lowest ($P<0.05$) apoptotic indexes ($4.5 \pm 1.1\%$, $8.4 \pm 2.5\%$, $3.4 \pm 1.1\%$ and $5.5 \pm 0.9\%$, respectively) when compared to T1 treatment ($10.0 \pm 1.4\%$). The number of inner cell mass did not differ ($P>0.05$) among embryos from different treatments. The addition of antioxidant obtained from oily extract of *Lippia origanoides* reduces the apoptosis rate and improves the quality without increasing the total *in vitro* production of bovine embryos.

Keywords: antioxidants, apoptosis, *Lippia origanoides*, *in vitro* embryo production.

INTRODUCTION

The *in vitro* embryo production (IVEP) has been one of the most important tools for multiplication and acceleration of genetic gain in bovine herds (Loiola *et al.*, 2014). Despite the improvements observed in recent years, this biotechnology still has limitations regarding to the blastocyst production rate and embryo freezing, mainly due to the composition of embryo culture media (Lonergan and Fair, 2008).

The *in vitro* culture conditions are affected by adverse agents, including reactive oxygen species (ROS) (Crocomo *et al.*, 2012). The oxidative stress caused by the imbalance between the production and elimination of ROS acts on cell membranes and cytoplasm causing alterations in lipids, proteins and nucleic acids. It damages the embryos by means of mitochondrial modifications, blockage of embryonic development, depletion of ATP and apoptosis (Guérin and Menezo, 2001).

To protect cells from the deleterious effects of excess ROS and to facilitate embryo development, culture media have been modified by the addition of antioxidants (Agarwal *et al.*, 2005) obtained from different plant sources. In this context, a shrub native to Central America and northeastern South America, *Lippia origanoides*, has shown great potential for traditional medicine because of its bioactive principles used to treat different diseases (Soares and Tavares-Dias, 2013). The oily extract extracted from this plant has antioxidant properties attributed to the action of thymol and carvacrol, elements found in its composition and responsible for increasing the concentrations of glutathione (Teixeira *et al.*, 2014). For this reason, it has been used in *in vitro* production of bovine embryos.

In view of the reduced cellular apoptosis rate related to the antioxidant property of oily extract of *Lippia origanoides*, previously tested only in *in vitro* maturation of bovine oocytes (Pereira, 2015), and considering that high apoptosis rate compromise the production of blastocysts and embryo viability (Madox-Hyttell *et al.*, 2003), the aim of this study was to evaluate the production and quality of bovine embryos produced *in vitro* with different concentrations of oily extract of *Lippia origanoides* in the embryo culture media.

MATERIAL AND METHODS

The trial was performed in accordance with the rules of the Ethics Committee on Animal Use - CEUA/UFMG (protocol 339/2016). All reagents and media used were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

The ovaries were obtained from slaughtered bovine females and transported in 0.9% NaCl saline solution at 38° C within a maximum period of 4 hours after sampling, to the laboratory of *in vitro* bovine embryo production of the Veterinary School of the Federal University of Minas Gerais. Follicles of 2-8mm were aspirated with 5mL syringes coupled to 40x12mm needles and the contents were deposited in 50mL Falcon Tubes for 10 minutes for sedimentation of follicular fluid.

The *cumulus*-oocyte complexes (COCs) were selected and washed in HEPES buffered TCM 199 medium supplemented with 22µg/mL sodium pyruvate, 50µg/mL amikacin sulfate and 10% fetal bovine serum (FBS). Oocytes with compact and non-expanded *cumulus*, with two or more layers of cells and homogeneous and intact cytoplasm were selected (Seneda *et al.*, 2001). The *in vitro* maturation medium (IVM) of oocytes was composed of bicarbonate-buffered TCM-199 supplemented with 10% FBS + 22µg/mL sodium pyruvate + 50µg/mL amikacin sulfate + 5µg/mL LH + 1µg/mL FSH. After filtration of medium through a cellulose membrane, 10µg/mL of estradiol and 2.5µg/mL of oily extract of *Lippia origanoides* were added in all treatments described below (Pereira, 2015). The COCs were regrouped in drops containing 10-15 oocytes and incubated in a culture oven (Thermo Scientific, USA) with a humid atmosphere at 5% CO₂, 38.5° C for 22-24 hours counted from the beginning of follicular aspiration.

After the evaluation of the rate of expansion, in the *in vitro* fertilization (IVF), the semen from a Holstein bull was used and previously tested for *in vitro* embryo production. Sperm selection was performed using the Percoll gradient technique (45-90%), described by Parrish *et al.* (1984). After centrifugation, the supernatant was removed and the spermatozoa was resuspended with 3mL of TALP medium, and once more centrifuged at 420xG for 5 minutes. An insemination dose of 2x10⁶ spermatozoids/mL was used. The oocytes were transferred to 70µL drops of IFV medium and co-incubated with spermatozoa under mineral oil and in humidified atmosphere at 5% CO₂, 38.5° C for 16-20 hours.

In the *in vitro* culture (IVC), *cumulus* cells were removed by manual and successive pipetting, and the zygotes were allocated to one of the following treatments:

- **Treatment 1** - SOF-m medium (*Synthetic Oviduct Fluid* modified) without antioxidant supplementation;

- **Treatment 2** - SOF-m medium (modified) supplemented with 50 μ M/mL of antioxidant Cysteamine, as standard antioxidant;

- **Treatment 3** - SOF-m medium (modified) supplemented with 2.5 μ g/mL of antioxidant obtained from oily extract of *Lippia origanoides*;

- **Treatment 4** - SOF-m medium (modified) supplemented with 5.0 μ g/mL of antioxidant obtained from oily extract of *Lippia origanoides*;

- **Treatment 5** - SOF-m medium (modified) supplemented with 10 μ g/mL of antioxidant obtained from oily extract of *Lippia origanoides*.

Embryo culture was performed at 38.5° C in a moisture-saturated atmosphere of 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂. After 72 hours post-insemination, the proportion of embryos that reached the 2-, 4- and 8-cell stages was evaluated to determine the cleavage rate (number of cleaved zygotes/total number of mature oocytes). At the end of the seventh day of culture (D7), the embryos were evaluated and properly classified according to their morphological aspect to determine the blastocyst rate (number of blastocysts/number of cultured oocytes). The embryos were fixed in 4% paraformaldehyde for the Terminal deoxynucleotidyl transferase (TUNEL) test.

To determine the apoptosis index, the DNA fragmentation in embryonic cells was evaluated by means of the TUNEL test. The cells were stained and their nuclei became evident, thus enabling the counting of total intact and apoptotic cells. The procedures were based on the methodology described by Pereira (2010) for bovine embryos. The commercial kit Dead End Fluorimetric TUNEL System (Promega, Madison, WI, USA) was used for the test. Blastocysts at different stages of development were washed in 100 μ L drops of phosphate saline solution (Nutricell®) supplemented with 0.1% Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma). Subsequently, they were fixed in 4% paraformaldehyde, washed again and stored in cryotubes at 4° C with saline solution plus 0.1% BSA. For the preparation of slides, the embryos were initially permeabilized by immersion in

phosphate saline solution with 0.2% Triton X-100 and incubated in equilibration buffer (180 μ L) with a mixture of nucleotides (20 μ L), rTdT enzyme (4 μ L) and fluorescein-12-dUTP that is responsible for staining the fragmented DNA. The embryos remained for 1 hour at 37° C in a humid chamber covered with aluminum foil. In the negative control, the embryos were incubated in equilibration buffer without rTdT enzyme. In the positive control, the embryos were incubated in equilibration buffer containing the DNase enzyme (2.7U/ μ L), responsible for promoting degradation of the DNA of embryonic cells, and with the enzyme fluorescein-12-dUTP.

In the next step, the embryos were transferred to dried and degreased slides stained with 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA). Subsequently, coverslips were applied. Embryonic cells (embryoblast, trophoblast, blastomeres) were labeled by DAPI (in blue) using a 460nm filter and the apoptotic cells were identified using a 520 \pm 20nm fluorescein filter (green). The slides were observed on an epifluorescence microscope (Bx 52, Olympus, Washington, USA) and photographed using the Image-Pro Plus 4.5 software (Media Cybernetics, Silver Spring, USA).

The total number of intact and apoptotic cells, the identification of cells belonging to the inner cell mass (ICM) and verification of the relationship between ICM and total embryonic cells were analyzed using the Image J program (Version 1.42e, 2008), following the methodology of Iwasaki *et al.* (1990). The apoptotic index was calculated from the ratio of total cell number and number of cells containing apoptotic bodies (Kidson *et al.*, 2004).

Data relative to rates of expansion, cleavage, blastocyst and *in vitro* bovine embryo production were previously analyzed for normality. Data were analyzed by ANOVA when normal, whereas the Kruskal-Wallis test was used to analyze the non-normal data. The evaluation of total cell number and apoptotic index was performed by the Shapiro-Wilk test to verify the normality of continuous variables. In the statistical analysis, the ANOVA (post-hoc Tukey) and Kruskal-Wallis tests were used at 5% significance. The Version 17.0 of the SPSS software (SPSS Inc, Chicago, USA) was used for all analyzes.

RESULTS AND DISCUSSION

The *in vitro* production of bovine embryos according to the concentration of oily extract of *Lippia origanoides* is shown in Tab. 1. The addition of different concentrations of *Lippia origanoides* did not modify ($P>0.05$) the rates of expansion, cleavage, blastocyst and total *in vitro* production of bovine embryos among treatments.

Table 1. Rates (mean \pm SD) of expansion, cleavage, blastocyst and total *in vitro* production of bovine embryos according to the concentration of oily extract of *Lippia origanoides* in embryo culture medium.

Treatment	N	Expansion rate (%)	Cleavage rate (%)	Blastocyst rate (%)
T1- 0 (Control)	720	95.6 \pm 5.6	61.0 \pm 21.6	27.6 \pm 18.3
T2 - 50 μ M/mL Cysteamine	720	93.2 \pm 16.8	59.4 \pm 20.1	22.2 \pm 12.7
T3- 2.5 μ g/mL <i>Lippia origanoides</i>	720	95.9 \pm 4.1	55.9 \pm 22.8	21.4 \pm 15.9
T4 - 5.0 μ g/mL <i>Lippia origanoides</i>	720	95.8 \pm 5.4	57.2 \pm 23.8	26.0 \pm 17.7
T5- 10.0 μ g/mL <i>Lippia origanoides</i>	720	95.9 \pm 4.8	54.6 \pm 19.5	20.6 \pm 13.2

In a study using similar concentrations of oily extract of *Lippia origanoides*, but only in *in vitro* maturation media of bovine oocytes, Pereira (2015) found rates of expansion, cleavage and blastocyst similar to those of the present study. Furthermore, there was no difference in variables between treatments, and the rates of embryo production remained within the expected pattern for the bovine species, as described by Feugang (2009). This result suggests that the supplementation with oily extract of *Lippia origanoides* in oocyte maturation and embryo culture media does not influence the rate of *in vitro* production of bovine embryos.

The blastocyst production rate in the culture medium containing 50 μ M/mL cysteamine, a standard antioxidant in commercial laboratory protocols used as a positive control in the present study, was 22.2 \pm 12.7%. This value is similar to the 29.1 \pm 2.7% of blastocysts in D7 found by Lojkic *et al.* (2012) for zygotes grown at the same concentration of cysteamine. A blastocyst rate of 24% was obtained by Merton *et al.* (2013) by adding 0.1mM cysteamine in oocyte maturation and *in vitro* culture media of bovine embryos. The positive action of cysteamine as an antioxidant results from the increase in glutathione synthesis through cysteine and, consequently, it has a beneficial effect on IVEP, increasing production and embryo quality (Zhou *et al.*, 2008).

Several antioxidants have been studied by different research groups in *in vitro* embryo culture media. Takahashi *et al.* (2016) studied the addition of the antioxidant N, N-Dimethylglycine (DMG) in the culture medium and obtained similar results of blastocyst production between treatments with and without supplementation ($57.1 \pm 8.2\%$ vs $65.0 \pm 5.5\%$, respectively). On the other hand, Lee *et al.* found an increase in blastocyst rate by supplementing the culture medium with 3,4-Dihydroxyflavone at $10\mu\text{M}$ compared to the treatment without this flavonoid (39.3% vs. 26.7% , respectively). These studies demonstrate that the direct comparison between different antioxidants in the same embryonic culture protocols has not yet been performed. Consequently, it is difficult to compare and determine the medium that best favors embryo production (Zullo *et al.*, 2016a) because there is great variability between protocols, especially when performed in different laboratories. This variability in response may be due to the interference of other factors, such as O_2 tension in the incubator, culture medium composition, fetal bovine serum concentration and water quality used in media production (Guerin and Menezo, 2001; Martin-Romero *et al.*, 2008). Some components of these factors increase the formation of ROS, leading to several cellular damages (Rocha-Frigoni *et al.*, 2015).

The apoptotic index and the number of total bovine embryonic cells of blastocysts produced *in vitro* in media containing different concentrations of oily extract of *Lippia origanoides* are shown in Table 2.

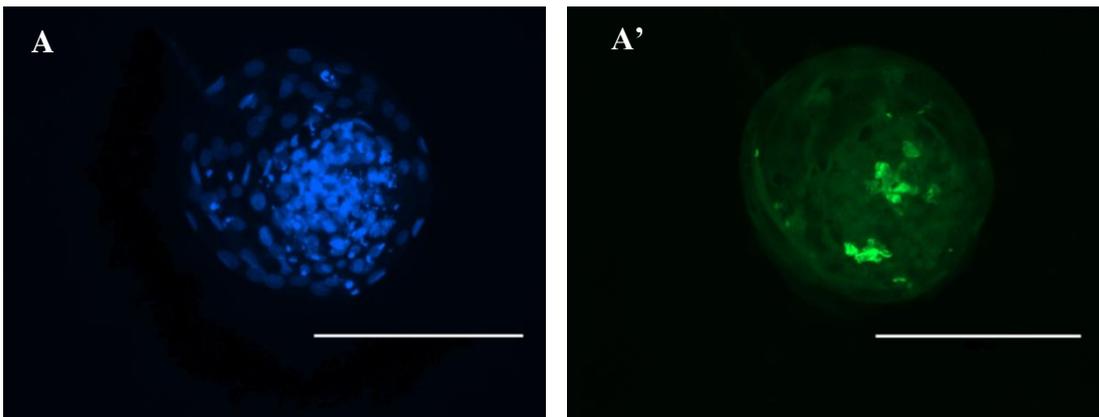
Table 2. Number of total embryonic cells, trophoctoderm cells (TE), inner cell mass (ICM), ICM:total cells and apoptotic cells in bovine blastocyst (B1) produced *in vitro*, on the seventh day of culture (D7) in media containing different concentrations of oily extract of *Lippia origanoides*.

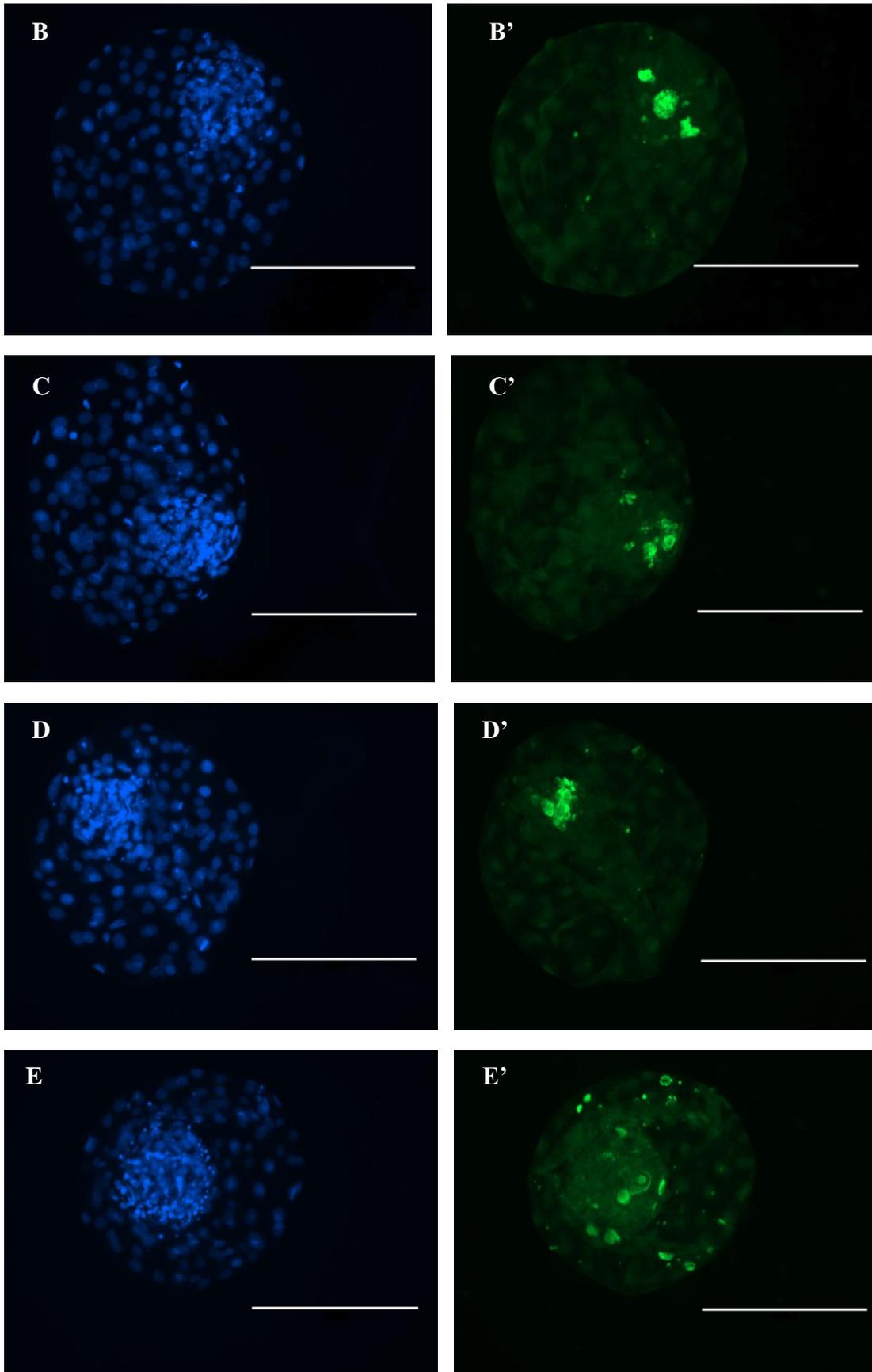
Treatment	B1 (n)	TE	ICM	Number of total cells	ICM:total cells (%)	Apoptotic index
T1 - 0 (Control)	11	123.1 ± 0.6	40.1 ± 1.4	163.3 ± 11.7^a	36.8 ± 12.3	10.0 ± 1.4^a
T2 - $50\mu\text{M/mL}$ Cysteamine	15	91.6 ± 2.5	39.1 ± 6.3	130.6 ± 14.3^{ab}	47.8 ± 17.9	4.5 ± 1.1^{bc}
T3 - $2.5\mu\text{g/mL}$ <i>Lippia origanoides</i>	9	56.1 ± 1.7	35.3 ± 9.3	91.4 ± 7.2^b	57.9 ± 15.2	8.4 ± 2.5^{ab}
T4 - $5.0\mu\text{g/mL}$ <i>Lippia origanoides</i>	14	78.1 ± 3.7	34.2 ± 13.9	112.3 ± 9.8^b	45.6 ± 15.2	3.4 ± 1.1^c
T5 - $10.0\mu\text{g/mL}$ <i>Lippia origanoides</i>	14	75.6 ± 4.2	39.0 ± 17.8	114.6 ± 9.6^b	51.0 ± 17.0	5.5 ± 0.9^{bc}

^{a,b,c} Means with different letters in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$) between treatments by Shapiro-Wilk test.

In the present study, the apoptosis rate (Fig. 1) of T1 (10.0 ± 1.4) was similar to T3 (8.4 ± 2.5) ($P > 0.05$), but higher than T2 (4.5 ± 1.1), T4 (3.4 ± 1.1) and T5 (5.5 ± 0.9) ($P < 0.05$). On the other hand, T2 was similar to all treatments ($P > 0.05$), except to T1 ($P < 0.05$). T3 was superior to T4 ($P < 0.05$) and similar to other treatments ($P > 0.05$). T4 was lower than T1 and T3 ($P < 0.05$) and similar to T2 and T5 ($P > 0.05$). T5 had a similar apoptosis rate compared to T2, T3 and T4 ($P > 0.05$) and lower than that observed in T1 ($P < 0.05$). The total cell number for T1 was 163.3 ± 11.7 , higher ($P < 0.05$) than that found in T3, T4 and T5 (91.4 ± 7.2 ; 112.4 ± 9.8 , 114.6 ± 9.6 , respectively) but similar ($P > 0.05$) to T2 (130.7 ± 14.3). The total cell number is in accordance with that reported for bovine species, as verified by other studies that also added antioxidants in the *in vitro* embryo culture medium (Pomar *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017).

Figure 1. Bovine blastocysts produced *in vitro* in culture media without supplementation (A and A'), with supplementation of 50 $\mu\text{M}/\text{mL}$ of cysteamine (B and B'), or with 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (C and C'), 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (D and D'), 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (E and E') of antioxidant obtained from oily extract of *Lippia origanoides*. DAPI-labeled embryonic cells, submitted to the TUNEL test, were visualized by epifluorescence microscopy (blue), and the apoptotic cells were stained by fluorescein (green). Scale bars represent 200 μm .





The values found in the present study are similar to those verified by other research groups that also used antioxidants to supplement the culture media for the *in*

in vitro production of bovine embryos. Zullo *et al.* (2016a,b), testing the antioxidant action of L-ergotoinin (amino acid) and crocetin (carotenoid) in the culture of bovine embryos produced *in vitro*, found no difference in embryo production rates, but a significant reduction in the percentage of apoptotic cells in blastocysts cultured in the presence of L-ergotoinin in relation to the control group ($3.6 \pm 0.3\%$ vs. $8.1 \pm 0.5\%$, respectively). The same was observed between the group supplemented with crocetin and the control group ($3.9 \pm 0.2\%$ vs. $7.4 \pm 0.3\%$, respectively). When the enzymatic antioxidant Peroxiredoxin 5 (PRDX5) was inhibited, Wang *et al.* (2017) found an increase in apoptotic index from $4.2 \pm 0.8\%$ to $11.9 \pm 2.1\%$ in blastocysts cultured with and without anti-PRDX-5, respectively.

The results found in the present study differ from those obtained by Sun *et al.* (2015) evaluating the addition of different concentrations of the antioxidant glutathione to the medium (1, 3, 5 and 7 mM). These authors found no difference in apoptotic index between the control treatment without supplementation ($7.9 \pm 3.1\%$) and the other treatments ($6.3 \pm 2.4\%$, $6.5 \pm 3.0\%$, $6.7 \pm 4.1\%$ and $6.7 \pm 3.5\%$, respectively).

The apoptosis rate in embryos cultured *in vitro* is higher than that found *in vivo*, and this pattern can be seen in all species (Pomar *et al.*, 2005). This demonstrates that *in vitro* culture leads to a reduction in the number of embryonic cells and, consequently, interferes with the quality of the future embryo. Although apoptosis is a physiological process to eliminate defective cells during the pre-implantation period, the high incidence of apoptosis is correlated with morphological damage that is decisive for embryo survival (Brison, 2000).

In addition to the apoptotic index evaluated by the TUNEL test, the total cell number located in the inner cell mass (ICM) and in trophoctoderm (TE) are also commonly used as parameters of embryonic quality (Koo *et al.*, 2002). In the present study, no difference was found in the relationship between ICM:total cell of embryos produced *in vitro* among the different treatments tested. The data found are similar to those obtained by Salzano *et al.* (2014) when evaluating the action of resveratrol in the embryo culture medium. These authors also did not verify significant differences in the proportion of ICM:total cells between the blastocysts produced without (29.1 ± 1.2) or in the presence of $0.5\mu\text{M}$ resveratrol (31.3 ± 1.3). However, other studies obtained different results in the proportion of ICM:total cells, which was higher in treatments

with antioxidants added to the *in vitro* culture media (Lee *et al.*, 2011; Zullo *et al.*, 2016a).

In the present study, all treatments had a high ICM:total cell, between 40 and 60%, which demonstrates that the embryos had good quality (Iwasaki *et al.*, 1990) and that this may be an additional criterion to effectively predict the quality of the embryo produced (Pomar *et al.*, 2005). The association of apoptotic index with the reduction in inner cellular mass index (ICM) and in the number of embryonic cells indicates that the non-use or the blockade of antioxidant action negatively affects embryo quality and viability (Wang *et al.*, 2017). This is due to the direct action of antioxidants in the epigenetic process, indirectly controlling gene expression during cell development, altering chromatin structures, DNA methylation and histone modification (Hitchler and Domann, 2007). In addition, ICM cells are known to contribute to the formation of embryonic tissues and extraembryonic membranes, whereas trophoblast cells are mainly linked to the formation of placental membranes (Fouladi-Nashta *et al.*, 2005).

CONCLUSION

Supplementation of culture media with antioxidants obtained from *Lippia origanoides* or standard antioxidant routinely used in *in vitro* production improves the ratio between number of embryonic cells and apoptotic index, directly affecting embryo quality without increasing the bovine blastocyst production rate, which makes it an alternative to be incorporated in laboratory procedures for *in vitro* embryo production.

REFERENCES

- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. K. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, v.3, p.1-21, 2005.
- BRISON, D. R. Apoptosis in mammalian preimplantation embryos: regulation by survival factors. *Hum. Fertil.*, v.3, p. 36-47, 2000.
- CROCOMO, L. F.; MARQUES FILHO, W. C.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. *et al.* Produção de embriões *in vitro*: estresse oxidativo e antioxidantes. *Vet. e Zootec.*, v.19, p.470-479, 2012.
- FEUGANG, J. M.; CAMARGO-RODRIGUEZ, O.; MEMILI, E. Culture systems for bovine embryos. *Livestock Science*, v.121, p.141-149, 2009.

FOULADI-NASHTA, A. A.; ALBERIO, R.; KAFI, M. *et al.* Differential staining combined with TUNEL labeling to detect apoptosis in preimplantation bovine embryos. *Reprod. Biol. Med. Online*, v.47, p.497-502, 2005.

GUÉRIN, P.; EL 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, p.175-189, 2001.

HITCHLER, M. J.; DOMANN, F. E. An epigenetic perspective on the free radical theory of development. *Free Radic. Biol. Med.*, v.43, p.1023- 1036, 2007.

IWASAKI, S.; YOSHIBA, N.; USHIJIMA, H. *et al.* Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized *in vitro* and *in vivo*. *J. Reprod. Fertil.*, v.90, p.279-284, 1990.

KIDSON, A.; RUBIO-POMAR, F. J.; VAN KNEGSEL, A. *et al.* Quality of porcine blastocysts produced *in vitro* in the presence or absence of GH. *Reproduction.*, v.127, p.165-177, 2004.

KOO, D. B.; KANG, Y. K.; CHOI, Y. H. *et al.* Aberrant allocations of inner cell mass and trophoctoderm cells in bovine nuclear transfer blastocysts. *Biol. Reprod.*, v.67, p. 487-492, 2002.

LEE, K. S.; KIM, E. Y.; JEON, K. *et al.* 3,4-Dihydroxyflavone acts as an antioxidant and antiapoptotic agent to support bovine embryo development *in vitro*. *J. Reprod. Dev.*, v.57, p.127-134, 2011.

LOIOLA, M. V. G.; CHALHOUB, M.; RODRIGUES, A. S. *et al.* Validação de um programa de produção *in vitro* de embriões bovinos com transporte de oócitos e de embriões por longas distâncias. *Ciên. Anim. Bras.*, v.15, p. 93-101, 2014.

LONERGAN, P.; FAIR, T. *In vitro* produced bovine embryos – Dealing with the warts. *Theriogenology*, v. 69, p. 17-22, 2008.

LOJKIC, M.; GETZ, I.; SAMARDZIJA, M. *et al.* Effect of cysteamine supplementation during *in vitro* culture of early stage bovine embryos on blastocyst rate and quality. *Acta. Vet.*, p.229–234, 2012.

MADDOX-HYTTELL, P.; GJORRET, J. O.; VAJTA, G. *et al.* Morphological assessment of preimplantation embryo quality in cattle. *Reprod. Suppl.*, v.61, p.103-106, 2003.

MARTIN-ROMERO, F. J.; MIGUEL-LASOBRAS, E. M.; DOMINGUEZ-ARROYO, J.A. *et al.* Contribution of culture medium to oxidative stress and its effects on human oocytes. *Reprod. Biomed. Online*, v.17, p.652-661, 2008.

MERTON, J. S.; KNIJN, H. M.; FLAPPER, H. *et al.* Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation of slaughterhouse and opu-derived bovine oocytes improves embryonic development without affecting cryotolerance, pregnancy rate and calf characteristics. *Theriogenology*, v.80, p.365-371, 2013.

PARRISH, J. J.; PARRISH, J. L.; FIRST, N. L. Effect of swim-up separation and heparin pre treatment of frozen-thawed spermatozoa on *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, v.30 (suppl. 1), p.112, 1984.

PEREIRA, E. C. M. Produção de oócitos e embriões bubalinos: efeitos da época do ano e da adição de óleo essencial de *Lippia origanoides* na maturação *in vitro*. 2015. 128f. Tese de Doutorado Biotecnologia Animal da FMVZ – UNESP – Botucatu.

POMAR, F. J. R.; TEERDS, K. J.; KIDSON, A. *et al.* Differences in the incidence of apoptosis between *in vivo* and *in vitro* produced blastocysts of farm animal species: a comparative study. *Theriogenology*, v.63, p.2254-2268, 2005.

ROCHA-FRIGONI, N. A. S.; LEÃO, B. C. S.; NOGUEIRA, E. *et al.* Effect of gaseous atmosphere and antioxidants on the development and cryotolerance of bovine embryos at different periods of *in vitro* culture, *Zygote*, v.23, p.159-168, 2015.

SENEDA, M. M., ESPER, C. R., GARCIA, J. M., OLIVEIRA, J. A., VANTINI, R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Anim. Reprod. Sci.*, v.67, p.37-43, 2001.

SALZANO, A.; ALBERTO, G.; ZULLO, G. *et al.* Effect of resveratrol supplementation during culture on the quality and cryotolerance of bovine *in vitro* produced embryos. *Anim. Reprod. Sci.*, v.151, p.91-96, 2014.

- SOARES, B. V.; TAVARES-DIAS, M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. *Biota Amazônia*, v. 3, p.109-123, 2013.
- SUN, W-J.; PANG, Y-W.; LIU, Y. *et al.* Exogenous glutathione supplementation in culture medium improves the bovine embryo development after *in vitro* fertilization. *Theriogenology*, v.84, p.716-723, 2015.
- TAKAHASHI, T.; SASAKI, K.; SOMFAI, T. *et al.* N,N-Dimethylglycine decreases oxidative stress and improves *in vitro* development of bovine embryos. *J. Reprod. Dev.*, v.62, p.209-212, 2016.
- TEIXEIRA, M. L.; CARDOSO, M. G.; FIGUEIREDO, A. C. S. *et al.* Essential oils from *Lippia origanoides* Kunth. and *Mentha spicata* L: chemical composition, insecticidal and antioxidant activities. *Am. J. Plant Sci.*, v.5, p.1181-1190, 2014.
- ZHOU, P.; WU, Y. G.; LI, Q. *et al.* The interactions between cysteamine, cystine and cumulus cells increase the intracellular glutathione level and developmental capacity of goat cumulus-denuded oocytes. *Reprod.*, v.135, p.605- 611, 2008.
- ZULLO, G.; ALBERO, G.; NEGLIA, G. *et al.* L-ergothioneine supplementation during culture improves quality of bovine *in vitro*-produced embryos. *Theriogenology*, v.85, p. 688-697, 2016a.
- ZULLO, G.; De GANDITIIS, C.; PERO, M. E. *et al.* Crocetin improves the quality of *in vitro*-produced bovine embryos: Implications for blastocyst development, cryotolerance, and apoptosis. *Theriogenology*, v.86, p.1879-1885, 2016b.
- WANG, L.; ZHANG, H.; WANG, Y. *et al.* Peroxiredoxin 5 is essential for *in vitro* development of bovine SCNT embryos. *Theriogenology*, p. 156-166, 2017.

CAPÍTULO 2

Morfometria de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* em meios de cultivo com Cisteamina e diferentes concentrações do extrato oleoso de *Lippia organoides*

Morfometria de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* em meios de cultivo com Cisteamina e diferentes concentrações do extrato oleoso de *Lippia origanoides*

N. V. Sollecito¹, E. C. M. Pereira², R. N. Alves², M. E. Beletti², M. S. Miranda³, J. K. R. da Silva³, A. M. Borges⁴

¹ Estudante de pós-graduação, Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, MG

² Faculdade Cidade de Coromandel, Uberlândia, MG

³ Faculdade de Biotecnologia, Universidade Federal do Pará

⁴ Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG

RESUMO:

O objetivo deste estudo foi avaliar a morfometria ultraestrutural de embriões bovinos produzidos *in vitro* cultivados em diferentes concentrações de antioxidantes. Os embriões foram obtidos por meio da aspiração de complexos *cumulus*-oócito (CCOs) de folículos ovarianos de vacas de abatedouros e submetidos à maturação e fecundação *in vitro*. Os possíveis zigotos foram distribuídos em cinco tratamentos, de acordo com a adição ou não de diferentes antioxidantes no meio de cultivo embrionário: **T1**) sem a adição de antioxidantes (Controle negativo); **T2**) adição de 50 µM/mL de Cisteamina; e **T3, T4 e T5**) adição de 2,5 µg/mL, 5,0 µg/mL e 10,0 µg/mL do antioxidante derivado do extrato oleoso extraído da *Lippia origanoides*, respectivamente. No sétimo dia de cultivo os embriões em estágio de blastocisto foram fixados e preparados para a microscopia de transmissão eletrônica. Os blastocistos foram avaliados quanto à proporção da área citoplasmática em relação à área do núcleo, das mitocôndrias, dos vacúolos, dos vacúolos autofágicos e de lipídeos. Observou-se que blastocistos cultivados em meios contendo adição do extrato oleoso de *Lippia origanoides* apresentaram parâmetros morfológicos como alta proporção célula:mitocôndrias e baixa de célula:vacúolos e célula:vacúolo autofágico, e que essas proporções são indicadores morfológicos de qualidade embrionária. Já as células da Massa Celular Interna (MCI) do tratamento sem antioxidantes apresentaram a maior proporção célula:vacúolo, o que também pode ser visto nas células do Trofoectodema (TE) do tratamento 2. Concluiu-se que, meios de cultivo embrionário suplementados com os antioxidantes presentes no óleo da *Lippia origanoides* produzem embriões com uma maior proporção citoplasmática de organelas fundamentais para o desenvolvimento embrionário, como as mitocôndrias, e que tratamentos sem antioxidantes ou com a adição de Cisteamina

podem aumentar a vacuolização citoplasmática, característica que ocasiona a produção de embriões de pior qualidade.

Palavras chave: antioxidantes, bovinos, *Lippia origanoides*, morfometria ultraestrutural, produção *in vitro* de embriões.

INTRODUÇÃO:

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotécnica bem conhecida e difundida na reprodução humana e animal. Porém, as condições de cultivo embrionário (Rizos *et al.*, 2008) ainda levam a limitações associadas à baixa qualidade dos embriões produzidos (Pereira *et al.*, 2005), que pode ser verificada por avaliações morfológicas, metabólicas e na expressão gênica dos mesmos.

Por ocorrer fora do ambiente natural (*in vivo*), o processo de produção *in vitro* expõe os gametas e embriões a fatores externos que potencializam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). A produção de EROs é um processo natural que ocorre em embriões, tal como em todos os tipos celulares. Resultado da oxidação fosforilativa mitocondrial, as EROs participam da regulação redox intracelular e de diversas vias de sinalização celulares, sendo cruciais no desenvolvimento embrionário (Ufer *et al.*, 2010; Timme-Laragy *et al.*, 2013). Porém, quando em excesso, sua ação pode reduzir a eficiência da PIVE (Crocomo *et al.*, 2012).

Normalmente o cultivo embrionário ocorre em condições em que há uma suplementação de antioxidantes aquém do necessário, o que desencadeia frequentemente a ocorrência do estresse oxidativo nestes tipos celulares (Elamaram *et al.*, 2012).

A adição de substâncias antioxidantes nos meios de cultivo tem sido a alternativa utilizada para mitigar os danos celulares causados pela condição biológica do estresse oxidativo neste tipo de biotécnica. O extrato oleoso da planta *Lippia origanoides*, um arbusto nativo da América do Sul, tem sido utilizado como opção de antioxidante que pode ser acrescentado em meios de maturação (Pereira, 2015) e cultivo *in vitro* (Sollecito *et al.*, 2018) de embriões bovinos. Por ser rica em compostos como carvacrol e timol, sua suplementação em meios de cultivo proporciona o incremento nas concentrações de glutathiona intracelulares (Teixeira *et al.*, 2014; Sarrazin *et al.*, 2015).

O objetivo deste estudo foi avaliar se o uso de diferentes antioxidantes interfere nas características ultraestruturais de blastocistos bovinos produzidos *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em conformidade com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFMG (Protocolo 339/2016). Todos os reagentes e meios utilizados no experimento foram obtidos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA).

Produção *in vitro* de embriões

Os ovários foram coletados de vacas de abatedouro e mantidos aquecidos a 38°C em solução salina NaCl 0,9% até o momento da aspiração folicular. No laboratório, os folículos de diâmetro entre 2-8 mm foram aspirados e o líquido folicular foi depositado em tubo Falcon de 50mL até a seleção dos complexos *cumulus*-oócitos (CCOs).

A seleção dos CCOs foi realizada em meio TCM-199 HEPES, suplementado com 22µg/mL de piruvato de sódio, 50µg/mL de sulfato de amicacina e 10% de soro fetal bovino (SFB). Foram selecionados oócitos com *cumulus* compacto, com duas ou mais camadas de células e citoplasma homogêneo e íntegro (Seneda *et al.*, 2001).

Os CCOs foram maturados por 22 a 24 horas em estufa com atmosfera úmida a 38,5°C e com 5% de CO₂ (Thermo Scientific, USA). O meio utilizado na maturação oocitária foi composto por TCM-199 Bicarbonato, suplementado com 10% SFB, 22µg/mL de piruvato de sódio, 50µg/mL de sulfato de amicacina, 5µg/mL de LH, 1µg/mL de FSH, 10µg/ml de estradiol e 2,5µg/mL do extrato oleoso de *Lippia origanoides*. Grupos de 15 oócitos foram maturados em gota de meio de maturação sob óleo mineral.

Na fecundação *in vitro* os espermatozoides foram selecionados por meio de Gradiente de Percoll (45-90%) (Parrish *et al.*, 1984). Após a primeira centrifugação (1700xG) os espermatozoides foram ressuspendidos em meio TALP e novamente centrifugados (420xG). O *pellet* formado de espermatozoides móveis foi diluído em meio FIV e adicionado em gotas de 70µL de meio FIV na dose inseminante de 14000 espermatozoides/gota. Os gametas foram co-incubados em atmosfera úmida a 5% de CO₂, a 38,5 °C, por 20 horas.

O cultivo *in vitro* foi realizado após o desnudamento por pipetagem mecânica dos prováveis zigotos. Os mesmos foram então cultivados em meio *Synthetic Oviduct Fluid* modificado (SOF-*m*) com 2,5% de SFB e separados segundo o respectivo tratamento: **T1**- meio de cultivo embrionário sem adição de antioxidante; **T2**- meio de cultivo embrionário com adição de 50µM/mL do antioxidante Cisteamina; e **T3, T4 e T5** - meio de cultivo embrionário com adição de 2,5µg/mL, 5,0µg/mL e 10,0µg/mL do antioxidante derivado do extrato oleoso de *Lippia origanoides*, respectivamente. O extrato oleoso de *Lippia origanoides* foi diluído primeiramente em DMSO formando-se a solução mãe. Em seguida a solução mãe era novamente diluída em TCM-199 HEPES para a adição do óleo nos meios de cultivo. No sétimo dia de cultivo (D7) os embriões em estágio de blastocisto (BI) foram preparados para análise em microscopia eletrônica de transmissão.

Microscopia eletrônica

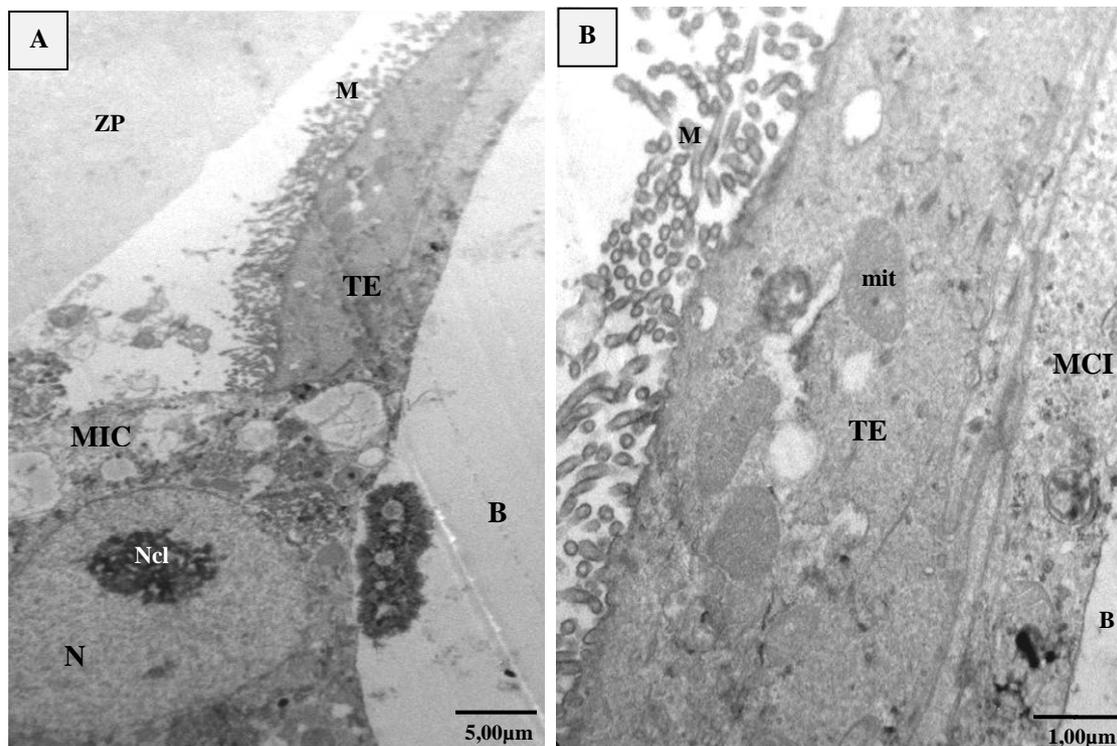
Para a microscopia eletrônica, 30 blastocistos (BI) de cada tratamento foram fixados em glutaraldeído 2,5% e tampão fosfato 0,1M. Após três lavagens em PBS+SFB (3%), os embriões foram depositados em tubos eppendorf de 600µl e, posteriormente, foi adicionado tetróxido de ósmio 1%, e a mistura permaneceu em repouso por 1 hora. O sobrenadante foi removido e os embriões presentes no *pellet* foram imersos em ágar 3%. Após a gelatinização do ágar, os mesmos foram acondicionado em frascos de vidro. Após sofrerem desidratações em concentrações crescentes de álcool, as amostras dos diferentes tratamentos ficaram imersas *overnight* em óxido propileno e resina 2:1. No dia seguinte, o material foi embebido por nova solução na concentração 1:1 de óxido propileno e resina. Após 12 horas as amostras foram mantidas *overnight* em estufa a 37°C e, no dia seguinte, foram descartadas as soluções e adicionado resina aos frascos, que permaneceram durante 4 horas em estufa a 37°C. O material foi colocado em formas de inclusão na estufa a 60°C por dois dias.

Foram realizados cortes ultrafinos com o Micrótopo Reichert-Jung, em contraste com acetato de uranil e citrato de chumbo e, em seguida, observados no microscópio eletrônico de transmissão Hitachi HT7700.

Morfometria

A análise morfométrica foi realizada utilizando-se um total de 100 micrografias eletrônicas para os blastocistos de cada tratamento, a partir de fotografias que mostravam cortes transversais das células embrionárias. Para a determinação da área citoplasmática total e das organelas foi utilizado o método de contagem de ponto a ponto do programa Image-J (Schneider *et al.*, 2012), descartando-se a área intercelular. Foi avaliada a proporção da área total celular em relação ao núcleo e às organelas mitocôndrias, vacúolos, vacúolos autofágicos e gotículas lipídicas.

Na análise foi verificada a área das células embrionárias, e por se tratarem de embriões em estágio de blastocisto (BI), (Fig. 1A e 1B) também foram avaliadas as proporções encontradas em dois tipos celulares presentes nesta fase de desenvolvimento, trofoectoderma (TE) (Fig.1C) e na massa celular interna (MCI) (Fig. 1D).



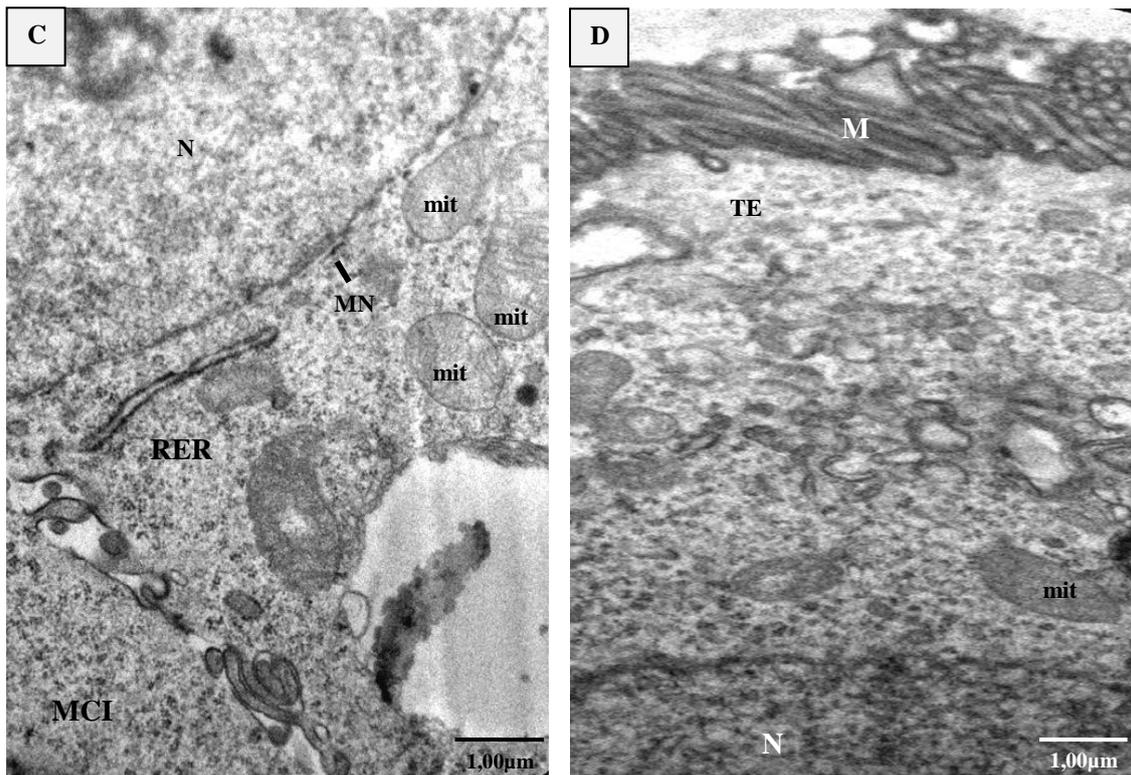


Figura 1. Blastocisto bovino. Eletromicrografia de células da Massa Celular Interna (MCI) (A e C) e do Trofoectoderma (TE) (B e D) de embriões bovinos produzidos *in vitro* no estágio de blastocisto (B1). Em detalhes podem ser vistos a Zona Pelúcida (ZP), o Núcleo (N), o Nucléolo (Ncl), as Microvilosidades (M) na superfície celular, a cavidade da Blastocèle (B), a Membrana Nuclear (MN), as Mitocôndrias (mit) e o Retículo Endoplasmático Rugoso (RER).

Análise estatística

Os dados de proporção entre a área citoplasmática e as demais organelas foram analisados por meio de ANOVA, quando obedeceram ao padrão de normalidade. Quando os dados não apresentavam distribuição normal aplicou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para constatação de possíveis variações estatisticamente significativas entre os tratamentos. O nível de significância utilizado foi de 95% ($P < 0,05$). Os dados foram avaliados por meio do software SPSS versão 17.0 (SPSS Inc, Chicago, USA).

RESULTADOS

Foram registrados os dados da área total das células e por meio dela foram realizadas medidas de proporção segundo a área encontrada para o núcleo (Cel:Nuc), mitocôndrias (Cel:Mit), vacúolos (Cel:V), vacúolos autofágicos (Cel:VA) e gotículas lipídicas (Cel: Lip) (Tabela 1).

Tabela 1. Proporção (%) entre a área total (μm) de células do Blastocisto (**Cel**) no sétimo dia de cultivo (D7) em relação à área do núcleo (**Nuc**), das mitocôndrias (**Mit**), dos vacúolos (**V**), dos vacúolos autofágicos (**VA**) e de gotículas lipídicas (**Lip**). Dados foram expressos em médias \pm erro padrão da média.

Grupos	Proporção (%)				
	Cel:Nuc	Cel:Mit	Cel:V	Cel:VA	Cel:Lip
T1- Sem antioxidantes	31,7 \pm 5,5 a	9,2 \pm 0,6 a	17,1 \pm 1,7 a	2,2 \pm 0,6 a	3,1 \pm 0,9 a
T2- 50μL Cisteamina	26,3 \pm 4,9 a	7,4 \pm 0,4 ab	17,0 \pm 1,0 a	5,7 \pm 1,8 b	2,2 \pm 0,4 a
T3- 2,5μg <i>Lippia origanoides</i>	39,6 \pm 4,2 a	10,2 \pm 0,5 ac	10,5 \pm 1,1 b	9,2 \pm 2,1 b	2,3 \pm 0,3 a
T4- 5,0μg <i>Lippia origanoides</i>	37,6 \pm 4,0 a	8,2 \pm 0,7 ab	12,8 \pm 1,7 b	6,6 \pm 1,6 b	1,2 \pm 0,1 a
T5-10,0 μg <i>Lippia origanoides</i>	33,8 \pm 3,3 a	6,8 \pm 0,4 b	9,6 \pm 0,9 b	6,8 \pm 1,2 b	2,4 \pm 0,3 a

^{abc}Médias com letras distintas na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$), pelo teste de Kruskal-Wallis.

A partir desses resultados foram mensuradas as áreas específicas de diferentes tipos celulares encontrado nos embriões. Por se tratar de embriões no estágio de Blastocisto, foram avaliadas as proporções obtidas das áreas das células encontradas na Massa Celular Interna (MCI) (Tabela 2) e no Trofoectoderma (TE) (Tabela 3), assim como a área de suas respectivas organelas.

Tabela 2. Proporção (%) entre a área total (μm) das células (**Cel**) da Massa Celular Interna (MCI) em relação ao núcleo (**Nuc**), mitocôndrias (**Mit**), vacúolos (**V**) e vacúolos autofágicos (**VA**). Dados foram expressos em médias \pm erro padrão da média.

Grupos	Proporção (%) MCI			
	Cel:Nuc	Cel:Mit	Cel:V	Cel:VA
T1- Sem antioxidantes	28,8 \pm 5,8 a	7,3 \pm 1,7 a	18,6 \pm 3,9 a	1,4 \pm 0,5 a
T2- 50μL Cisteamina	41,1 \pm 6,7 a	6,0 \pm 0,7 a	16,0 \pm 2,2 ab	4,6 \pm 1,3 a
T3- 2,5μg <i>Lippia origanoides</i>	41,6 \pm 6,8 a	9,7 \pm 1,27a	10,1 \pm 1,8 ab	15,1 \pm 10,2a
T4- 5,0μg <i>Lippia origanoides</i>	43,7 \pm 6,4 a	5,7 \pm 1,4 a	6,3 \pm 2,8 b	4,9 \pm 0,2 a
T5-10,0 μg <i>Lippia origanoides</i>	44,6 \pm 9,2 a	8,1 \pm 1,1 a	9,8 \pm 3,1 ab	4,3 \pm 1,4 a

^{abc}Médias com letras distintas na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$), pelo teste Kruskal-Wallis.

Tabela 3. Proporção (%) entre a área total (μm) das células (**Cel**) do Trofoectoderma (TE) em relação ao núcleo (**Nuc**), mitocôndrias (**Mit**), vacúolos (**V**), vacúolos autofágicos (**VA**) e às gotículas lipídicas (**Lip**). Dados foram expressos em médias \pm erro padrão da média.

Grupo	Proporção (%) TE	Cel:Nuc	Cel:Mit	Cel:V	Cel:VA	Cel:Lip
T1- Sem antioxidantes		33,6 \pm 8,5 ab	9,6 \pm 0,6 ab	16,8 \pm 1,8 ab	2,4 \pm 0,7 a	3,2 \pm 1,1 a
T2- 50μL Cisteamina		17,7 \pm 5,6 a	7,7 \pm 0,5 b	17,2 \pm 1,1 a	6,4 \pm 2,8 a	2,2 \pm 0,4 a
T3- 2,5μg <i>Lippia origanoides</i>		37,9 \pm 5,5 b	10,4 \pm 0,6 a	10,6 \pm 1,4 bc	8,5 \pm 2,1 a	2,1 \pm 0,4 a
T4- 5,0μg <i>Lippia origanoides</i>		33,7 \pm 5,0 b	8,8 \pm 0,8 b	14,9 \pm 2,0 abc	7,0 \pm 2,0 a	1,4 \pm 0,2 a
T5-10,0 μg <i>Lippia origanoides</i>		31,0 \pm 3,4 b	6,4 \pm 0,4 c	9,5 \pm 0,9 c	7,5 \pm 1,5 a	1,0 \pm 0,2 a

^{abc}Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$), pelo teste de Kruskal-Wallis.

A proporção área célula:núcleo não diferiu entre os tratamentos quando analisados para os diferentes tipos celulares do blastocisto e entre as células da MCI ($P > 0,05$). Ao avaliar as células do Trofoectoderma (TE), encontrou-se diferença ($P < 0,05$) do tratamento 2 em relação aos tratamentos com a adição extrato oleoso de *Lippia origanoides* no cultivo (T3, T4 e T5), tendo maior proporção de núcleo nessas últimas, quando comparado com a primeira. Porém, quando o T2 foi comparado com o T1, não houve diferença ($P > 0,05$). O tratamento 1 também não diferiu ($P > 0,05$) dos tratamentos com o uso da *Lippia origanoides*.

A proporção entre a área célula:mitocôndrias das células de blastocistos e do trofoectoderma foram maiores ($P < 0,05$) para embriões do T3, que apresentaram a maior proporção dessas organelas por área, enquanto T5 apresentou a menor proporção ($P < 0,05$). Nas células da MCI não houve diferença ($P > 0,05$) dessa proporção entre os diferentes tratamentos.

Quanto à proporção da área célula:vacúolo das células do B1, os tratamentos 1 e 2 apresentaram a maior ($P < 0,05$) quantidade de vacúolos distribuídos no citoplasma em relação aos demais tratamentos suplementados com o extrato oleoso de *Lippia origanoides*. Essa característica de elevada proporção de vacúolos por área citoplasmática também foi observada nas células da MCI e do TE para o tratamento 2 ($P < 0,05$). A menor proporção foi verificada no T4 da MCI e no T5 do TE ($P < 0,05$).

Na avaliação dos vacúolos autofágicos, foi verificada menor ($P < 0,05$) proporção de célula:vacúolos autofágicos em blastocistos do tratamento 1 em relação aos demais. Nas células da MCI e TE foram encontrados poucos vacúolos dessa categoria ($P > 0,05$).

A proporção da área célula:lipídeos nas células dos blastocistos, na MCI e no TE também não diferiram ($P>0,05$) entre os tratamentos.

DISCUSSÃO

O uso de antioxidantes na PIVE tem mostrado resultados promissores quanto a melhoria da qualidade dos embriões, avaliada por meio do incremento na criotolerância, bem como na redução da taxa de apoptose embrionária, aumentando o desenvolvimento pós-implantação e o sucesso na transferência de embriões (Sun *et al.*, 2015; Rocha-Frigoni *et al.*, 2016; Zullo *et al.*, 2016ab).

Baseada na análise morfométrica verificou-se no presente estudo que a suplementação do meio de cultivo embrionário com antioxidantes pode induzir alterações na morfologia ultraestrutural das organelas intracelulares de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* que, indiretamente, está relacionado à qualidade do embrião.

Dentre as organelas avaliadas, a proporção da área da célula:núcleo não diferiram, exceto nas células do trofoectoderma do tratamento 2, o que pode estar relacionado com a baixa taxa de divisão celular (Crosier *et al.*, 2001), reduzindo a diferenciação e o número de células nesse tratamento.

Ao avaliar a área mitocondrial e sua proporção em relação à área citoplasmática, verificou-se diferença nas células embrionárias e no trofoectoderma. As mitocôndrias são organelas extremamente importantes para o pleno desenvolvimento embrionário, pois são responsáveis por gerar energia para as demais atividades celulares por meio do fornecimento de ATP (Wilding *et al.*, 2009; Chappel, 2013). Por isso, além da avaliação no número é essencial que essas organelas apresentem a conformação normal, com cristas bem desenvolvidas e distribuídas em toda a matriz mitocondrial (Cheville, 2009).

Apesar do tratamento 5 (Fig. 2C) apresentar menor proporção entre área total citoplasmática e a área de suas mitocôndrias, nesse tratamento as mitocôndrias possuíam cristas bem evidentes e numerosas, ao contrário dos tratamentos 1 e 3 que, apesar de proporção de área maior, apresentavam mitocôndrias com cristas esparsas e com a presença de vacúolos intramitocondriais (Fig. 2A e 2B). Segundo Bavister e Squirrel (2000), as mitocôndrias encontradas em oócitos e embriões no início do desenvolvimento são estruturalmente imaturas, com conformação arredondada ou oval, exibindo poucas cristas e presença de vacúolos, se alongando e aumentando o número

de cristas mitocondriais após as primeiras clivagens. Por isso, deve-se avaliar conjuntamente a proporção de área ocupada na célula por mitocôndrias, sua morfologia, que tem relação positiva com a qualidade celular.

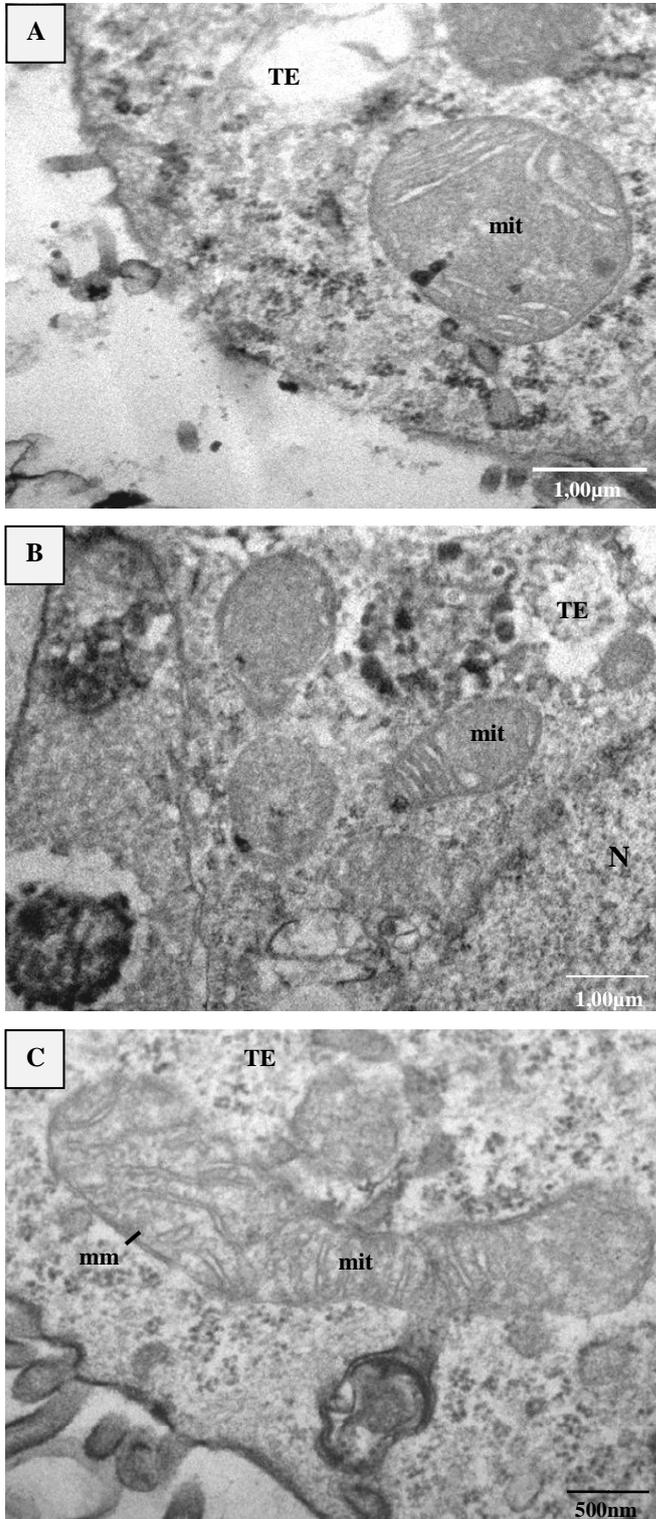


Figura 2. Blastocisto bovino. Eletromicrografia dos tipos de mitocôndrias (**mit**) encontradas nas células do **TE** de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* em diferentes meios de cultivo. **A)** Mitocôndrias (**mit**) do tratamento 1 (sem adição de antioxidantes) com a região central sem cristas. **B)** Mitocôndrias do tratamento 3 (adição de 2,5µg/mL de *Lippia organoides*) contendo poucas cristas. **C)** Mitocôndrias pertencentes ao tratamento 5 (adição de 10,0µg/mL de *Lippia organoides*) alongadas com a membrana mitocondrial (**mm**) evidenciada e cristas numerosas.

Como o presente estudo foi realizado com embriões no estágio de blastocisto, após a transição materno-zigótica, é comum encontrar aumento do número mitocondrial e das cristas em sua membrana interna. O tratamento 3 apresentou alta proporção célula:mitocôndria mas menor quantidade de cristas mitocondriais.

O aumento no número de mitocôndrias está correlacionado com a fragmentação das mesmas e com o aumento do número de corpos apoptóticos, tal como foi demonstrado por Karbowski e Youle (2003) em estudo que indicou elevação de fragmentos apoptóticos nos resultados do teste TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*). Resultado semelhante foi encontrado por nosso grupo de pesquisa (Sollecito *et al.*, 2018) que ao utilizar as mesmas concentrações do óleo extraído da *Lippia origanoides* no cultivo embrionário (2,5; 5,0 e 10,0 µg/mL), encontraram maiores índices apoptóticos em tratamentos que não adicionaram ou que suplementaram o meio com a menor concentração desse extrato oleoso (2,5µg/mL de *Lippia origanoides*). Da mesma forma, quando correlacionados com o presente estudo, os tratamentos com 5,0 e 10,0 µg/mL de *Lippia origanoides* apresentaram as maiores proporções ($P < 0,05$) de mitocôndrias por área citoplasmática.

Os vacúolos são inclusões citoplasmáticas ligadas à membrana, repletos de fluido semelhante ao encontrado no fluido perivitelino, e seu número e tamanho variam significativamente entre células. O tamanho dos vacúolos pode aumentar espontaneamente ou por meio da fusão entre vesículas pré-existentes, derivadas do Retículo Endoplasmático Liso e/ou do Complexo de Golgi. Porém, mesmo que se trate de um evento natural, o aumento da vacuolização nas células gaméticas e embrionárias está fortemente associado com a falha na produção *in vitro* (Van Blerkon, 1990). O mesmo pode ser observado em embriões humanos derivados de ICSI e PIVE, no qual a vacuolização teve impacto negativo na formação de blastocistos (Ebner *et al.*, 2005).

Os tratamentos 1 e 2 apresentaram as maiores proporções de vacúolos por área citoplasmática dos blastocistos (Fig. 3A e 3B), e os mesmos se apresentavam na forma esférica e com coloração cinza claro ou translúcida. Nos demais tratamentos também foi possível observar esse tipo de vesículas, porém em menor proporção (Fig.3C). Apesar das células da MCI também apresentarem áreas de vacuolização, a maior área foi encontrada nas células do TE. Esse achado condiz com a maioria dos trabalhos que avaliaram a morfologia embrionária e que verificaram maior vacuolização nas células do Trofoectoderma (TE) (Ebner *et al.*, 2005; Hardarson *et al.*, 2012), e que pode ser

explicada como uma estratégia embrionária para minimizar a vacuolização exacerbada da MCI no momento da implantação (Ebner *et al.*, 2011).

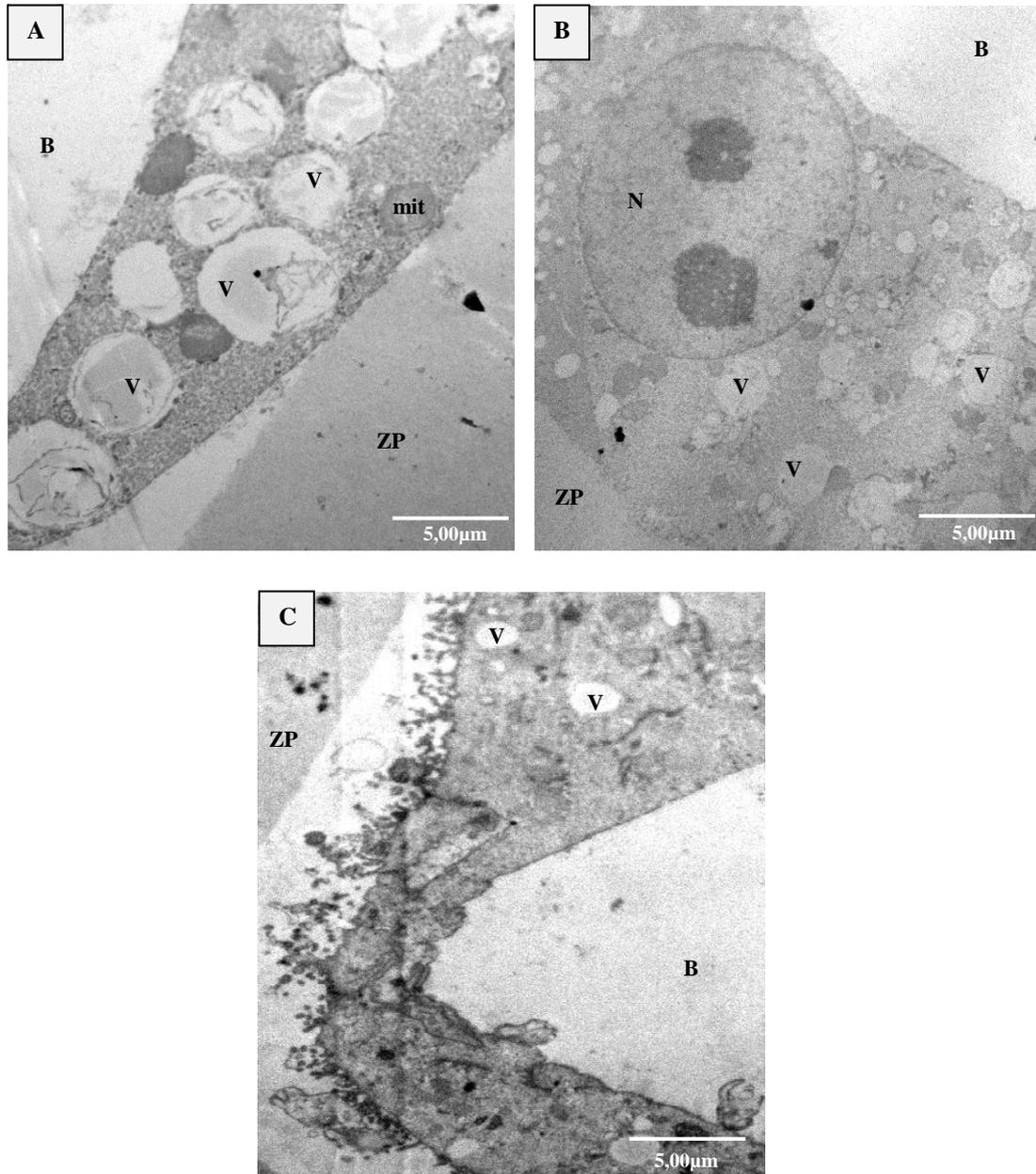
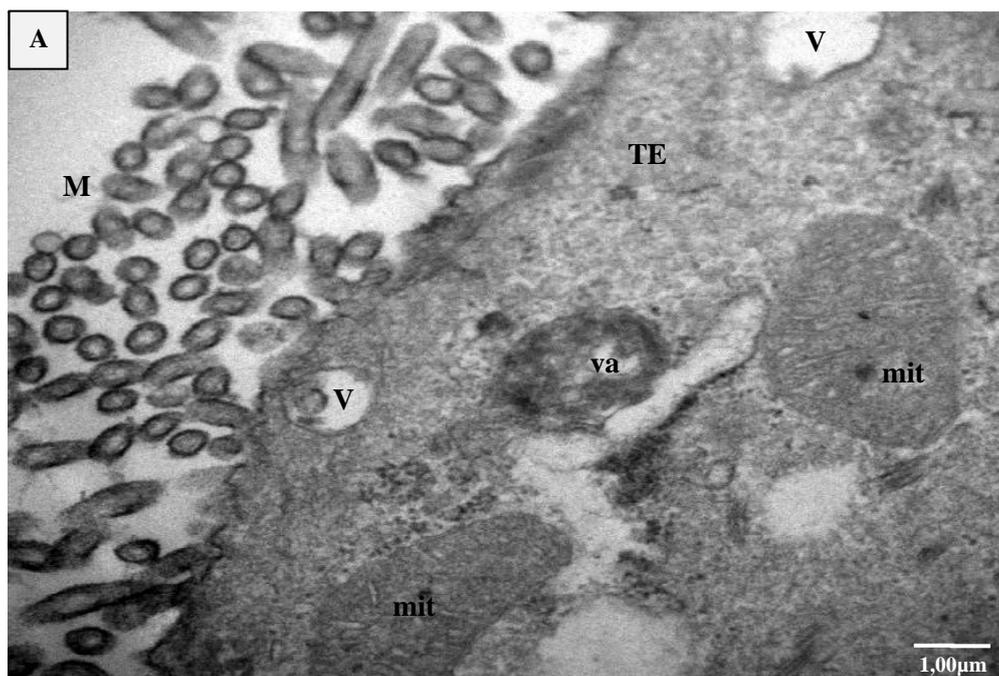


Figura 3. Blastocisto bovino. Eletromicrografia de células do Trofoectoderma (TE) de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **A)** Vacúolos de diversos tamanhos são observados no interior de blastocistos cultivados sem suplementação de antioxidantes (tratamento 1). **B)** Vacúolos presentes em blastocistos cultivados em meio suplementado com 50µM/mL do antioxidante Cisteamina (tratamento 2). **C)** Vacúolos pequenos presentes nos blastocistos cultivados com 10,0 µg/mL do óleo extraído da

Lippia origanoides (Tratamento 5). Podem ser observados detalhes do Núcleo (N), Zona Pelúcida (ZP), Blastocole (B), Vacúolos (V) e Mitocôndrias (mit).

Os vacúolos podem progredir para a formação dos vacúolos do tipo autofágicos (ou autolisossomos) que são responsáveis por realizarem o mecanismo normal de eliminação de organelas velhas e ineficientes. Porém, quando há aumento desses vacúolos, significa que há injúria focal intracelular subletal, causada por agente nocivo (Cheville, 2009). Estudos recentes mostraram que a autofagia serve para diminuir os danos causados pela produção excessiva de EROs e manter a homeostase celular (Shin *et al.*, 2014).

No presente estudo tornou-se evidente a diferença entre o aspecto dos vacúolos, como pode ser verificado na Figura 4. Apesar do tratamento 1 possuir menor quantidade de vacúolos autofágicos ($P < 0,05$), ele possuía maior quantidade de vacúolos translúcidos ou com a presença de substância amorfa mais clara em seu interior. Nos demais tratamentos, que possuíam mais vacúolos do tipo autofágico, os aspectos foram variáveis, mas apresentavam em sua maioria coloração mais escura, podendo-se haver ou não um limite bem definido. Isso pode ser explicado pelo fato de se tratar de um vacúolo que realiza a digestão de outras organelas, podendo estar em diversos estádios de degradação, até que chegue à produção de um corpo residual que contenha resíduos lipídicos elétron-densos não digeridos (Cheville, 2009).



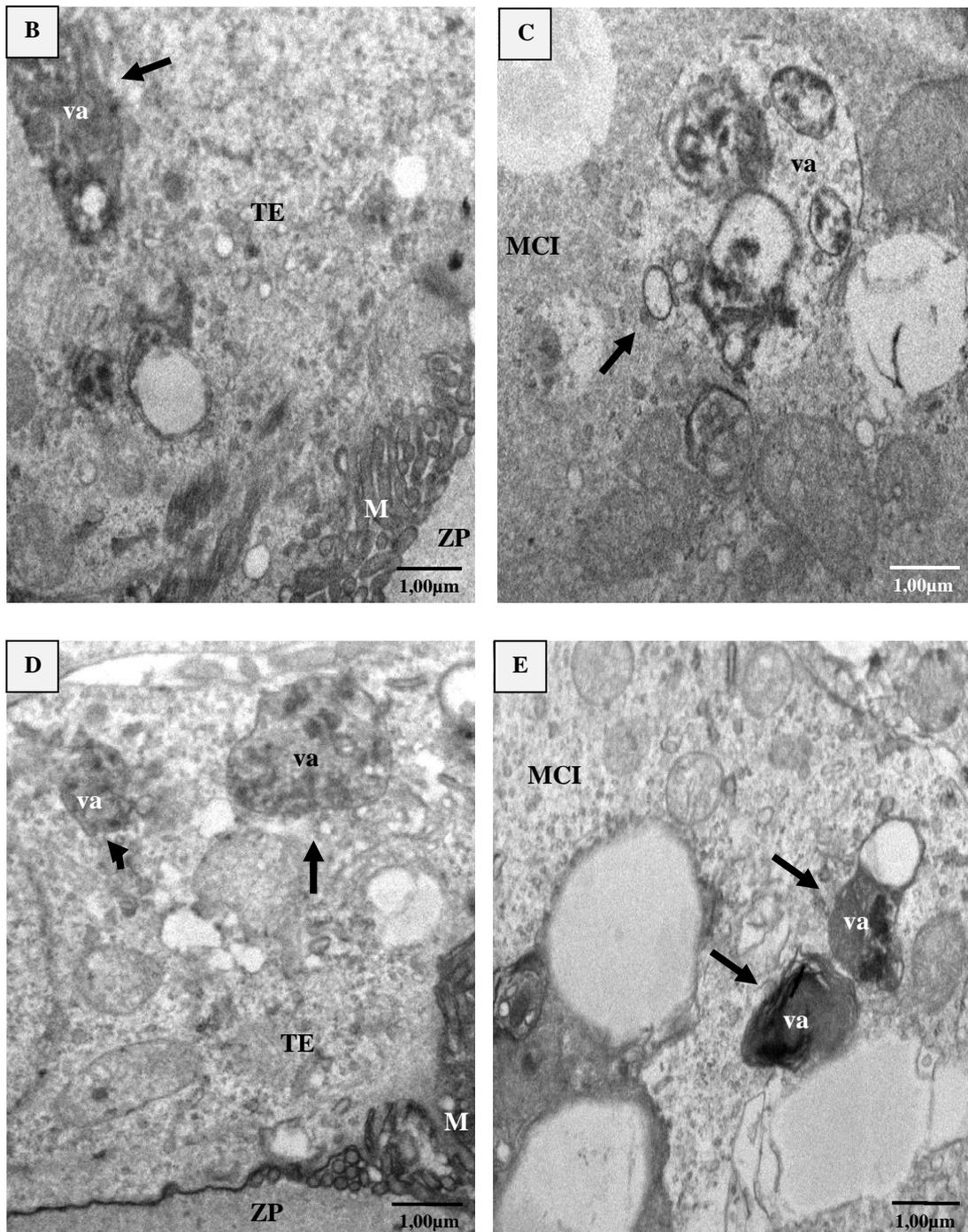


Figura 4. Blastocisto Bovino. Eletromicrografia das células do Trofoectoderma (TE) e da Massa Celular Interna (MCI) de embriões bovinos produzidos *in vitro* contendo vacúolos autofagocitários (va) em vários estágios. **A)** Tratamento 1, **B)** Tratamento 2, **C)** Tratamento 3, **D)** Tratamento 4 e **E)** Tratamento 5. Os vacúolos autofágicos estão sendo indicados pelas setas.

A relação morfológica entre as mitocôndrias e os vacúolos autofágicos também foi verificada no presente estudo. Foi possível observar que a autofagia muitas vezes

iniciava-se da degeneração mitocondrial, demonstrada pela proximidade dos vacúolos com mitocôndrias que aparentemente estariam perdendo o formato (apoptóticas) (Fig. 5). Esta associação pode ser justificada pela tentativa de eliminar mitocôndrias possivelmente defeituosas (Mortensen *et al.*, 2010), de modo a possibilitar que o embrião prossiga com seu desenvolvimento.

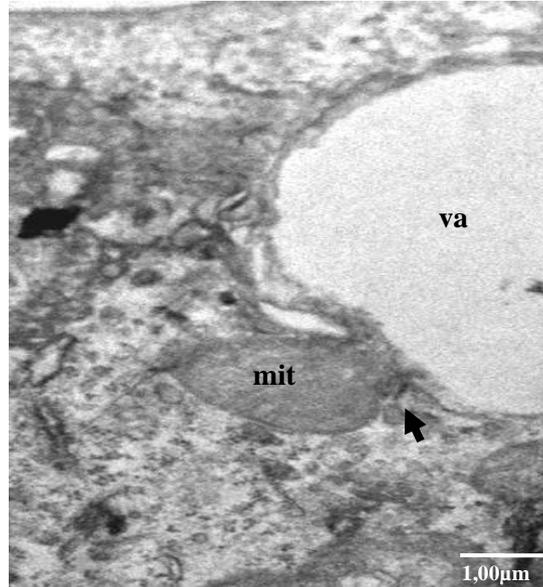


Figura 5. Blastocisto bovino. Eletromicrografia da célula de um embrião bovino produzido *in vitro* no estágio de Blastocisto (B1) evidenciando a degeneração mitocondrial (**mit**) por meio do processo de autofagia. A seta indica o local onde ocorre a formação do vacúolo autofágico (**va**).

Já ao analisar as gotículas de lipídeos presentes nas células embrionárias, a proporção em relação à área total celular foi baixa em todos os tratamentos utilizados para suplementar o meio de cultivo, não havendo diferença entre eles ($P>0,05$). Esse achado diverge do encontrado no trabalho de Crosier *et al.*(2001), que ao realizar um estudo morfométrico verificaram a presença de grandes volumes de gotículas de lipídeos em embriões bovinos produzidos *in vitro*. Tal resultado foi explicado pela adição de soro fetal bovino (10%) ao meio de cultivo. Apesar do presente estudo também ter realizado a adição do SFB no meio de cultivo, o mesmo estava numa concentração menor (2,5%) o que poderia justificar a menor proporção lipídica do citoplasma das células embrionárias.

As gotículas de lipídeos são correlacionadas de forma negativa com o processo de congelamento e vitrificação embrionários, interferindo e prejudicando o sucesso da

transferência de embriões após essa etapa (Pereira e Marques, 2008). Trabalhos recentes demonstraram que os embriões bovinos produzidos *in vitro* em meios em que houve adição de diversos tipos de antioxidantes, se tornaram mais criotolerantes (Zullo *et al.*, 2016 ab; Salzano *et al.*, 2014).

Em associação com esses trabalhos, os achados morfológicos do presente estudo sugerem que, mesmo não havendo uma diferença estatística na proporção entre área da célula em relação à área das gotículas lipídicas ($P > 0,05$), os tratamentos suplementados com antioxidantes (T2, T3, T4 e T5) podem acarretar na melhoria da qualidade embrionária na criopreservação, justificada pela redução dos lipídeos no citoplasma de embriões cultivados nesses tratamentos.

CONCLUSÃO

O cultivo *in vitro* de embriões bovinos em meios suplementados com o extrato oleoso de *Lippia origanoides* induziu alterações morfométricas ultraestruturais nos blastocistos produzidos, como maior proporção de área mitocondrial e menor de vacúolos, que pode indicar melhor qualidade embrionária.

Agradecimentos

Essa pesquisa contou com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), da Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA-Gado de leite).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAVISTER, B. D.; SQUIRRELL, J. M. Mitochondrial distribution and function in oocytes and early embryos. *Hum. Reprod.*, v. 15, n.2, p.189-198, 2000.

CHAPPEL, S. The role of mitochondria from mature oocyte to viable blastocyst. *Obstet. Gynecol. Int.*, p.10, 2013.

CHEVILLE, N. F. Ultrastructural pathology The comparative cellular basis of disease. Second Edition, Iowa, USA: Wiley-Blackwell; 2009.

CROCOMO, L. F.; MARQUES FILHO, W. C.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; et al. Produção de embriões *in vitro*: estresse oxidativo e antioxidantes. *Vet. e Zootec.*, v.19, n.4, p.470-479, 2012.

CROSIER, A. E.; FARIN, P. W.; DYKSTRA, M. J.; et al. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced *in vivo* or *in vitro*. *Biol. Reprod.*, v.64, p.1375–1385, 2001.

EBNER, T.; MOSER, M.; SOMMERGRUBER, M. Occurrence and developmental consequences of vacuoles throughout preimplantation development. *Fertil. Steril.*, v.83, n.6, p.1635-1640, 2005.

EBNER, T.; VANDERZWALMEN, P.; SHEBL, O.; et al. aspects of human blastocysts and the impact of vitrification. *J. Reproduktionsmed. Endokrinol.*, v.8, n.1, p.13-20, 2001.

ELAMARAN, G.; SINGH, K. P.; SINGH, M. K.; et al. Oxygen concentration and cysteamine supplementation during *in vitro* production of Buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos affect mRNA expression of BCL-2, BCL-XL, MCL-1, BAX and BID. *Reprod. Domest. Anim.*, v.47, n.6, p.1027-36, 2012.

HARDARSON, T.; VAN LANDUYT, L.; JONES, G. The blastocyst. *Hum. Reprod.*, v.27, n.1, p.72–91, 2012.

KARBOWSKI, M.; YOULE, R. J. Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ.*, v.10, p.870–880, 2003.

MORTENSEN, M.; FERGUSON, D. J.; EDELMANN, M.; et al. Loss of autophagy in erythroid cells leads to defective removal of mitochondria and severe anemia *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.107, p.832-837, 2010.

PARRISH, J. J.; PARRISH, J. L.; FIRST, N. L. Effect of swim-up separation and heparin pretreatment of frozen-thawed spermatozoa on *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, v.30 (suppl 1), p.112, 1984.

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

PEREIRA, E. C. M. Produção de oócitos e embriões bubalinos: efeitos da época do ano e da adição de óleo essencial de *Lippia origanoides* na maturação *in vitro*. 2015. 128f. Tese de Doutorado Biotecnologia Animal da FMVZ – UNESP – Botucatu.

PEREIRA, R. M.; MARQUES, C. C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell Tissue Bank*, v.9, p.267-277, 2008.

RIZOS, D.; CLEMENTE, M.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; et al. Consequences of *in vitro* culture conditions on embryo development and quality. *Reprod. Domest. Anim.*, v.43, n.4, p.44-50, 2008.

ROCHA-FRIGONI, N. A. S.; LEÃO, B. C. S.; DALL'AQUA, L. C.; et al. Improving the cytoplasmic maturation of bovine oocytes matured *in vitro* with intracellular and/or extracellular antioxidants is not associated with increased rates of embryo development, *Theriogenology*, v.86, p.1897-1905, 2016.

SALZANO, A.; ALBERTO, G.; ZULLO, G.; et al. Effect of resveratrol supplementation during culture on the quality and cryotolerance of bovine *in vitro* produced embryos. *Anim. Reprod. Sci.*, v.151, p.91-96, 2014.

SARRAZIN, S. L. F.; DA SILVA, L. A.; OLIVEIRA, R. B.; et al. Antibacterial action against food-borne microorganisms and antioxidant activity of carvacrol-rich oil from *Lippia origanoides* Kunth. *Lipids Health Dis.*, v.14, p.145, 2014.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods*, v.9, p.671-675, 2012.

SENEDA, M. M.; ESPER, C. R.; GARCIA, J. M.; et al. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Anim. Reprod. Sci.*, v.67, p.37-43, 2001.

SHIN, H.; CHOI, S.; LIM, H. J. Relationship between reactive oxygen species and autophagy in dormant mouse blastocysts during delayed implantation. *Clin. Exp. Reprod. Med.*, v.41, n.3, p.125-131, 2014.

SOLLECITO, N. V.; PEREIRA, E. C. M.; GRAZIA, J. G. V.; et al. Antioxidant activity of essential oil obtained from *Lippia origanoides* improves the quality of bovine embryos produced *in vitro*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 2018 (*in press*).

SUN, W. J.; PANG, Y. W.; LIU, Y.; et al. Exogenous glutathione supplementation in culture medium improves the bovine embryo development after *in vitro* fertilization. *Theriogenology*, v.84, p.716-723, 2015.

TEIXEIRA, M. L.; CARDOSO, M. G.; FIGUEIREDO, A. C. S.; et al. Essential oils from *Lippia origanoides* Kunth. and *Mentha spicata* L: chemical composition, insecticidal and antioxidant activities. *Am. J. Plant. Sci.*, v.5, p.1181-1190, 2014.

TIMME-LARAGY, A. R.; GOLDSTONE, J. V.; IMHOFF, B. R.; et al. Glutathione redox dynamics and expression of glutathione-related genes in developing embryo. *Free Radic. Biol. Med.* v.65, p.89-101, 2013.

UFER, C.; WANG, C. C.; BORCHERT, A.; et al. Redox control in mammalian embryo development. *Antioxid. Redox. Signal*, v.13, p.833-875, 2010.

VAN BLERKOM, J. Occurrence and development consequences of aberrant cellular organization in meiotically mature human oocytes after exogenous ovarian hyperstimulation. *J. Electron. Microsc. Tech.*, v.16, p.324-346, 1990.

ZULLO, G.; ALBERO, G.; NEGLIA, G.; et al. L-ergothioneine supplementation during culture improves quality of bovine *in vitro*-produced embryos. *Theriogenology*, v.85, p.688-697, 2016a.

ZULLO, G.; DE GANDITIIS, C.; PERO, M. E.; et al. Crocetin improves the quality of *in vitro*-produced bovine embryos: Implications for blastocyst development, cryotolerance, and apoptosis. *Theriogenology*, v.86, p.1879-1885, 2016b.

WILDING, M.; COPPOLA, G.; DALE, B.; et al. Mitochondria and human preimplantation embryo development. *Reproduction*, v.137, p.619-624, 2009.

CAPÍTULO 3

**Expressão gênica da enzima antioxidante PRDX-1 de embriões bovinos produzidos
in vitro em meios de cultivo com extrato oleoso de *Lippia origanoides***

Expressão gênica da enzima antioxidante Peroxirredoxina 1 (PRDX-1) de embriões bovinos produzidos *in vitro* em meios de cultivo com extrato oleoso de *Lippia origanoides*

N. V. Sollecito¹, E. D. de Souza², E. C. M. Pereira³, E. B. M. Silva¹, L. S. A. Camargo²,
M. S. Miranda⁴, J. K.R. da Silva⁴, A.M. Borges⁵

¹ Estudante de pós-graduação, Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, MG

² Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Juiz de Fora, MG, Brasil

³ Faculdade Cidade de Coromandel, Uberlândia, MG

⁴ Faculdade de Biotecnologia, Universidade Federal do Pará

⁵ Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG

RESUMO

O extrato oleoso obtido da planta *Lippia origanoides* tem potentes ações antioxidantes quando adicionada ao meio de cultivo embrionário *in vitro*. O objetivo desse estudo foi avaliar influência da adição desse óleo na expressão gênica da enzima antioxidante Peroxirredoxina 1 (PRDX-1). Os oócitos obtidos de ovários de abatedouro foram maturados e fecundados *in vitro* segundo procedimento padrão para a espécie bovina. E, 20 horas após a fecundação, os possíveis zigotos foram cultivados em meio SOFm suplementados com antioxidante constituindo cinco tratamentos diferentes: **T1:** sem adição de antioxidantes; o **T2:** adição de 50µM/mL de Cisteamina; e **T3, T4 e T5** com adição de 2,5µg/mL, 5,0µg/mL e 10,0µg/mL do extrato oleoso de *Lippia origanoides*, respectivamente. No sétimo dia de cultivo (D7), embriões no estágio de blastocisto (B1) foram criopreservados para posterior análise da expressão gênica por meio de RT-PCR. Foi verificado que os embriões provenientes do tratamento T3 apresentaram menor expressão gênica para PRDX-1 ($0,47 \pm 0,43$) ($P < 0,05$), quando comparado com os demais tratamentos. Considerando os tratamentos cujo meio de cultivo foi acrescido de diferentes concentrações do extrato oleoso da *Lippia origanoides*, o T5 apresentou aumento na expressão da PRDX-1 ($2,28 \pm 1,36$) ($P < 0,05$), sugerindo que maiores concentrações desse antioxidante (10,0µg/mL) foram capazes de elevar a expressão desse gene, conferindo maior efeito de proteção aos embriões contra o estresse oxidativo.

Palavras-chaves: antioxidantes, bovino, *Lippia origanoides*, PRDX-1, produção *in vitro* de embriões.

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos é uma das biotécnicas reprodutivas mais difundidas no Brasil na última década (Viana *et al.*, 2017), porém, ainda existem alguns entraves que limitam a qualidade e viabilidade dos embriões obtidos *in vitro*, quando comparados com os obtidos *in vivo* (van Wagtenonk-de Leeuw *et al.*, 2000).

Durante a produção *in vitro*, o embrião fica exposto a diversos agentes externos que geram produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que são capazes de modificar as moléculas biológicas (lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos), induzindo ao desenvolvimento anormal e à morte embrionária (Ufer e Wang, 2011).

Para contornar esse prejuízo, a adição de antioxidantes ao meio de cultivo embrionário tem se tornado rotineira, visando minimizar os danos causados pelas EROs, de forma a proteger as células de seus eventuais efeitos deletérios (Agarwal *et al.*, 2014; Zullo *et al.*, 2016). Além disso, os antioxidantes tem o efeito de influenciarem diretamente a expressão gênica por meio da reprogramação genética, impedindo que haja a metilação do DNA e das histonas (Hitchler e Domann, 2007), e modulando a expressão de enzimas antioxidantes como as Peroxirredoxinas (PRDXs) (Leyens *et al.*, 2004; Cox *et al.*, 2010).

As PRDXs pertencem a uma família de proteínas que tem importante papel nas vias de sinalização celular e no controle das concentrações intracelulares de peróxidos, estão presentes em todos os compartimentos celulares agindo como antioxidantes de organismos vivos (Neumann e Cao, 2009), com sua expressão sendo modulada pelo estresse oxidativo (Cox *et al.*, 2010; Hall *et al.*, 2009).

Dentre os antioxidantes utilizados em meios de cultivo celulares, destaca-se o extrato oleoso de *Lippia origanoides*, uma planta presente na região norte do Brasil, que apresenta predominantemente em sua composição o carvacrol (47,2%) e timol (12,8%), que tem forte propriedade antioxidante (Sarrazin *et al.*, 2015). Devido ao grande potencial de seus princípios bioativos, o extrato oleoso de *Lippia origanoides* também

tem sido testado no meio de maturação oocitário (Pereira, 2015) e no meio de cultivo (Sollecito *et al.*, 2018) melhorando a qualidade de embriões produzidos *in vitro*.

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações do extrato oleoso de *Lippia origanoides* em meios de cultivo embrionário interferiu na expressão gênica da enzima PRDX-1 em embriões bovinos produzidos *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em conformidade com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFMG, pelo número de protocolo 339/2016. Todos os reagentes e meios utilizados no experimento foram obtidos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA).

2.1. Produção *in vitro* de embriões bovinos

Os ovários foram obtidos de vacas de abatedouro e transportados em solução salina NaCl 0,9% a 38°C. No laboratório de produção *in vitro* de embriões bovinos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, os complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) foram aspirados de folículos antrais (2-8mm de diâmetro) e lavados em meio TCM-199 HEPES suplementado com 22µg/mL de piruvato de sódio, 50µg/mL de sulfato de amicacina e 10% de soro fetal bovino (SFB). Foram selecionados oócitos com *cumulus* compacto e não expandido, com duas ou mais camadas de células e citoplasma homogêneo e íntegro (Seneda *et al.*, 2001).

A maturação ocorreu em meio TCM-199 Bicarbonato, suplementado com 10% SFB + 22µg/mL de piruvato de sódio + 50µg/mL de sulfato de amicacina + 5µg/mL de LH + 1µg/mL de FSH, 10µg/mL de estradiol e 2,5µg/mL do extrato oleoso de *Lippia origanoides*. Grupos de 15 oócitos foram maturados em gota de 70µL de meio MIV sob óleo mineral por 22-24 horas em estufa de cultivo com 5% CO₂ (Thermo Scientific, USA) em atmosfera úmida a 38,5°C (Pereira, 2015).

Os CCOs maturados foram transferidos para gotas de 70µL de meio FIV e co-incubados com espermatozoides sob óleo mineral. Utilizou-se sêmen de touro da raça holandesa, previamente testado na produção *in vitro* de embriões, e a seleção espermática foi realizada pela técnica de gradiente Percoll (45-90%) (Parrish *et al.*, 1984). Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e os espermatozoides

resuspendidos em 3mL de meio TALP sêmen, e novamente centrifugados a 420xG, por 5 minutos. O *pellet* formado foi diluído em meio FIV e adicionado em cada gota na dose inseminante de 14000 espermatozoides. Os gametas foram co-incubados em atmosfera úmida a 5% de CO₂, a 38,5 °C por 20 horas.

Os prováveis zigotos foram desnudados por meio de sucessivas pipetagens mecânicas, as células do *cumulus* removidas e então cultivados *in vitro* em *Synthetic Oviduct Fluid Medium*- modificado (SOF_m). Neste momento, os zigotos foram distribuídos nos diferentes tratamentos: **T1** - meio de cultivo sem adição de antioxidantes; **T2** - meio de cultivo + 50µM/mL Cisteamina; **T3** - meio de cultivo + 2,5µg/mL do extrato oleoso de *Lippia origanoides*; **T4** - meio de cultivo + 5,0µg/mL do extrato oleoso de *Lippia origanoides*; **T5** - meio de cultivo + 10,0µg/mL de do extrato oleoso de *Lippia origanoides*. O cultivo embrionário foi realizado a 38,5°C com 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂ em umidade saturada. No terceiro dia de cultivo (D3) após a inseminação, a proporção de embriões que clivaram em 2, 4 e 8 células foi determinado pela taxa de clivagem calculada pelo número de zigotos clivados/número de oócitos cultivados, enquanto a taxa de blastocistos foi avaliada no sétimo dia (D7) calculada pelo número total de blastocistos/número de oócitos cultivados. Também no D7, os embriões foram avaliados quanto seu aspecto morfológico e devidamente classificados (Stringfellow e Seidel, 1998).

2.2. Extração do RNA, transcrição reversa e PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

As análises da expressão gênica foram realizadas em parceria com o Laboratório de Genética Molecular da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Gado de Leite), localizada em Juiz de Fora, Minas Gerais.

Para essas análises, os embriões de sete dias (D7) em estágio de blastocisto (n=10 por tratamento) foram lavados em DPBS adicionado de 0,1% de PVP e transferidos para criotubos de 1,5 mL RNA-free em volume de 5µL. Os criotubos foram imersos imediatamente em nitrogênio líquido (-196°C) e armazenados a -80°C até o momento da análise. Foram utilizadas triplicatas de 10 embriões por tratamento.

O RNA total foi extraído dos embriões usando solução RLT de lise/desnaturação do Micri Kit RNAeasy (Quiagen) de acordo com as especificações do fabricante. A concentração e pureza do RNA e cDNA, isolado das amostras, foi determinado pelo NanoDrop ND-1000 espectrofotometro (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

Todas as amostras tiveram razão 260/280 acima de 1,90 e razão 260/230 de 2,0 ou maior (Tabela 1).

As amostras de RNA foram imediatamente submetidas à transcrição reversa utilizando o kit TaqMan[®] Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems[®], Carlsbad, CA, USA) com Oligo dT, para obtenção do DNA complementar (cDNA). No termociclador Biocycler MJ25 (Biosystems, Brasil), o RNA foi incubado com Oligo dT a 65°C por 5min e resfriado a 4°C por 2min; o mix de reagentes foi adicionado de acordo com as normas do fabricante (volume final de cada reação de 20µL) e as amostras foram aquecidas no termociclador a 37°C durante 30min e a 95°C por 5min; então, foram resfriadas a 4°C e o cDNA obtido foi armazenado em freezer a -20°C até a realização da qPCR. O cDNA foi quantificado por espectrofotometria utilizando NanoDrop ND-1000 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), e todas as amostras apresentaram, em média, 688ng/µL (Tabela 1). A amplificação do cDNA foi realizada no equipamento StepOnePlus[™] Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems[®], São Paulo, SP, Brasil), utilizando Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems[®], Warrington, UK).

Tabela 1. Quantificação dos embriões realizada com 1 µL do RNAm e do cDNA obtida após a extração e a transcrição reversa para cada tratamento e repetição.

Tratamentos	Quantificação do RNAm	Quantificação do cDNA
TI- 0 (Controle) (Repetição 1)	5,9 ng/µL	689,1 ng/µL
T2 - 50µM/mL Cisteamina (Repetição 1)	6,2 ng/µL	670,8 ng/µL
T3- 2,5µg/mL <i>Lippia origanoides</i> (Repetição 1)	9,9 ng/µL	693,8 ng/µL
T4- 5,0µg/mL <i>Lippia origanoides</i> (Repetição 1)	8,3 ng/µL	694,9 ng/µL
T5-10,0µg/mL <i>Lippia origanoides</i> (Repetição 1)	6,8 ng/µL	649,9 ng/µL
TI- 0 (Controle) (Repetição 2)	7,0 ng/µL	703,8 ng/µL
T2 - 50µM/mL Cisteamina (Repetição 2)	4,1 ng/µL	693,3 ng/µL
T3- 2,5µg/mL <i>Lippia origanoides</i> (Repetição 2)	12,0 ng/µL	676,0 ng/µL
T4 – 5,0µg/mL <i>Lippia origanoides</i> (Repetição 2)	10,0 ng/µL	682,7 ng/µL
T5- 10,0µg/mL <i>Lippia origanoides</i> (Repetição 2)	12,1 ng/µL	686,4 ng/µL
TI- 0 (Controle) (Repetição 3)	10,7 ng/µL	692,3 ng/µL
T2 - 50µM/mL Cisteamina (Repetição 3)	7,4 ng/µL	697,4 ng/µL
T3- 2,5µg/mL <i>Lippia origanoides</i> (Repetição 3)	7,0 ng/µL	688,4 ng/µL
T4 – 5,0µg/mL <i>Lippia origanoides</i> (Repetição 3)	8,4 ng/µL	684,2 ng/µL
T5- 10,0µg/mL <i>Lippia origanoides</i> (Repetição 3)	5,5 ng/µL	717,7 ng/µL

Os *primers* utilizados para avaliar a expressão do gene alvo (PRDX-1) e dos genes endógenos (*GAPDH* e *YWHAZ*) (Tabela 2) foram desenhados utilizando o programa Primer3 a partir de sequências obtidas do banco de dados do GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) e a sequência do *primer GAPDH* adotada segundo Leutenegger *et al.* (2000).

Tabela 2. Sequência de *Primers* para análise da quantidade de transcritos de embriões bovinos produzidos *in vitro*

Genes	Sequencia de <i>Primer</i> (5'-3')	Temperatura de ligação	Tamanho do fragmento (bp)	Nº sessão Genbank
GAPDH	F:GGCGTGAACACGAGAAGTATAA R:CCCTCCACGATGCCAAAGT	53°C	120	Leutenegger <i>et al.</i> (2000)
YWHAZ	F:GCAAAAGACGGAAGGTGCTG R:CCTCAGCCAAGTAGCGGTAG	59°C	197	NM_174814.2
PRDX1	F:CAAAGCAACAGCTGTTATGC R:GAGAATCCACAGAAGCACC	53°C	197	Leyens <i>et al.</i> (2004)

2.3. Análise estatística

Para determinação da eficiência dos *primers* de cada reação foi utilizado o *software* LinRegPCR[®] e o valor encontrado foi considerado no cálculo da quantificação relativa. A análise dos resultados do PCR quantitativo foi realizada utilizando o *software* REST[®], sendo que os resultados foram expressos relativos a um calibrador. Para avaliação da expressão foi utilizado como calibrador embriões do grupo controle. Deste modo, os dados obtidos foram expressos como N vezes relativas ao tratamento calibrador. Os resultados do grupo endógeno de referência e controle foram analisados pelo *software* REST[®] (Pfaff *et al.*, 2002) considerando P<0,05 nível de significância. Os valores são apresentados como média ± erro padrão da média.

3. RESULTADOS

A expressão gênica da PRDX-1 em embriões bovinos produzidos *in vitro* não diferiu na quantidade de transcritos entre o grupo controle sem suplementação, o T2 (1,28 ± 1,27) contendo antioxidante cisteamina, T4 (0,75 ± 0,58) e T5 (1,07 ± 0,99) (P>0,05). No entanto, meio de cultivo embrionário contendo menor concentração do

extrato oleoso de *Lippia origanoides* (2,5µg/mL; T3) tiveram menor ($P<0,05$) expressão do PRDX-1 ($0,47 \pm 0,43$) podendo ser considerado sub-expresso nos embriões cultivados nessas concentrações (Fig. 1).

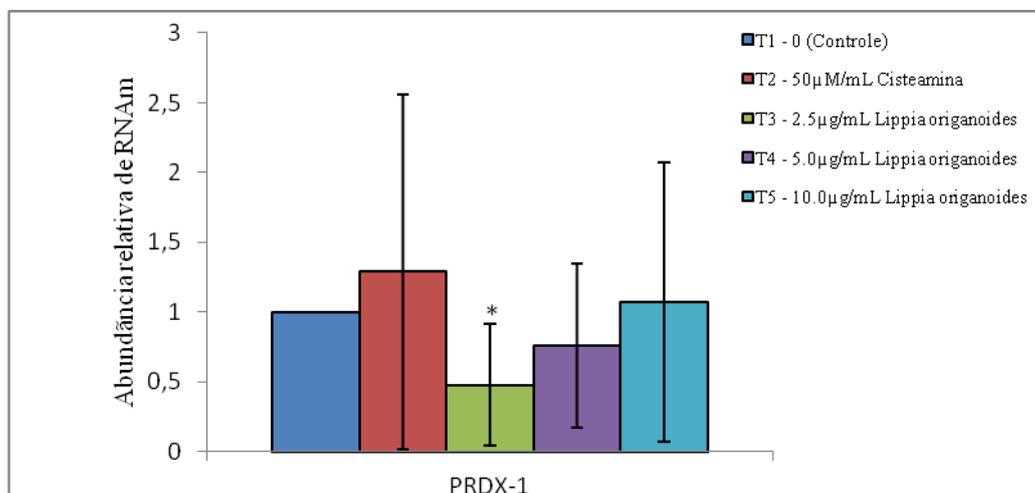


Figura 1. Avaliação da abundância dos transcritos para PRDX-1 em blastocistos bovinos cultivados *in vitro* em tratamentos contendo diferentes concentrações de antioxidante derivado do extrato oleoso da planta *Lippia origanoides*. Valores estão expressos em médias \pm erro padrão da média. * $P<0,05$ diferença entre os tratamentos.

As taxas de clivagem e de produção de blastocistos foram avaliadas no terceiro (D3) e sétimo (D7) dia de cultivo, respectivamente (Tabela 3) e não diferiram ($P>0,05$) entre os tratamentos contendo ou não diferentes concentrações de antioxidantes.

Tabela 3. Taxas (médias \pm erro padrão da média) de clivagem e de produção *in vitro* de blastocistos bovinos. Dados foram expressos em médias \pm erro padrão da média.

Tratamento	<i>n</i>	Taxa de Clivagem (%)	Taxa de blastocitos (%)
TI- 0 (Controle)	360	73,81 \pm 1,90	44,37 \pm 4,63
T2 - 50µM/mL Cisteamina	360	61,73 \pm 5,15	38,70 \pm 3,86
T3- 2,5µg/mL <i>Lippia origanoides</i>	360	73,57 \pm 4,17	38,73 \pm 7,33
T4 - 5,0µg/mL <i>Lippia origanoides</i>	360	81,45 \pm 4,38	49,33 \pm 9,15
T5- 10,0µg/mL <i>Lippia origanoides</i>	360	74,04 \pm 1,59	31,03 \pm 6,61

$P>0,05$, pelo teste de *t* de Student.

4. DISCUSSÃO

A menor ou maior expressão das Peroxirredoxinas tem sido relacionada diretamente ao estresse oxidativo, que é um estado biológico causado pelo desequilíbrio entre a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade do organismo em depurá-las. O estresse oxidativo gera várias injúrias a diversas estruturas celulares, dentre elas o DNA. Alterações no DNA modificam a expressão genética de várias proteínas, como a PRDX-1 que é uma enzima antioxidante que tem sua expressão influenciada pela presença de H₂O₂ no meio, sendo responsáveis pelo seu sequestro devido a grande afinidade entre os mesmos (Cox *et al.*, 2010).

Além disso, a PRDX-1 tem capacidade de se ligar a diversas proteínas sinalizadoras de estresse, regulando a ação de sinalização de acordo com a intensidade do estresse (Neumann e Cao, 2009; Hofmann *et al.*, 2002). O presente estudo obteve baixa quantidade de transcritos da PRDX-1 no T3, sugerindo que a diferença na expressão desse gene reflita na situação intracelular a uma menor proteção ao estresse oxidativo nos embriões cultivados nesse tratamento.

Esses resultados corroboram com os obtidos por Sollecito *et al.* (2018), no qual embriões bovinos produzidos *in vitro* foram cultivados nas mesmas condições com a adição das mesmas concentrações do extrato oleoso de *Lippia origanoides* (2,5µg/mL, 5,0µg/mL e 10,0µg/mL), e apresentaram altos índices de apoptose no tratamento suplementado com 2,5µg/mL do extrato oleoso de *Lippia origanoides* (8,4 ± 2,5%) (P<0,05). Esse resultado condiz com o que foi encontrado por Wang *et al.* (2017) que, ao avaliar a ação da PRDX-5, outra isoforma de Peroxirredoxina, no desenvolvimento de embriões bovinos, observaram que a inibição dessa enzima antioxidante desencadeia a apoptose das células embrionárias, e que a regulação da expressão de mRNA da PRDX-5 e de suas proteínas ocorrem em situações de estresse oxidativo desencadeando a apoptose embrionária.

Esses resultados representam a relação da expressão de genes como a PRDX-1 e seu papel na proteção celular. Altos índices de apoptose são encontrados, pois as PRDXs conseguem exercer um papel de proteção celular até determinada concentração de H₂O₂. Quando a concentração de H₂O₂ está muito elevada, há a ativação de uma quinase denominada c-Abl. Localizada preferencialmente no núcleo celular, essa tirosina quinase c-Abl, é responsável por inúmeros processos como diferenciação, divisão e adesão celular, e em desencadear a apoptose como resposta ao estresse (Cao *et*

al., 2003; Sirvent *et al.*, 2008). Assim, a diferença da expressão da PRDX-1 entre os tratamentos pode justificar a variação dos índices apoptóticos verificados por Sollecito *et al.* (2018).

Acredita-se que outro possível agente regulador da expressão da PRDX-1 nas células esteja vinculado às concentrações do próprio antioxidante presente no meio de cultivo embrionário. O óleo essencial utilizado na suplementação dos meios de cultivo do presente estudo foi extraído de uma espécie arbustiva presente desde a América Central até a América do Sul denominada *Lippia origanoides* Kunth. A “salva-doramarajó” ou “alecrim d’angola” (da Silva *et al.*, 2017), como é conhecida popularmente, possui em sua composição grandes quantidades dos componentes timol e carvacrol (Leyens *et al.*, 2004), que são fenóis monoterpênicos encontrados em diversas plantas aromáticas (Nostro e Papalia, 2012).

O timol e carvacrol, quando adicionados em meios de cultivo celular, tem a capacidade de exercer efeitos antimutagênicos e protetores das cadeias de DNA, principalmente quando há exposição as EROs do tipo peróxidos, impedindo que haja a ruptura de suas fitas. Isso foi demonstrado por Horvathova *et al.* (2007) e Slamenova *et al.* (2007) que realizaram pré-tratamento das células cultivadas com a suplementação de timol e carvacrol. Em ambos os trabalhos, houve aumento significativo da resistência do DNA aos danos causados pelo H₂O₂ demonstrando a importância desses compostos na proteção celular quando exposta ao estresse oxidativo.

A suplementação desses compostos fenóis também foi responsável pelo aumento significativo dos níveis de outros antioxidantes como a enzima glutatona, vitamina C e vitamina E (Aristale *et al.*, 2010). Logo, ao adicionar o extrato oleoso de *Lippia origanoides* ao meio de cultivo embrionário, este se torna enriquecido com altas concentrações de timol e carvacrol, aumentando a disponibilidade de enzimas antioxidantes como PRDX-1. Sugerindo que haja uma ação dose-dependente do antioxidante presente no óleo de *Lippia origanoides*, é possível justificar porque o tratamento com a menor concentração desse óleo (2,5 µg/mL) teve também uma menor expressão de PRDX-1.

Apesar de interferir na expressão gênica da PRDX-1, as diferentes concentrações de antioxidante não influenciaram na taxa de clivagem e na taxa de blastocistos do presente estudo (P>0,05) o que também foi observado em outros trabalhos que suplementaram o meio de cultivo embrionário com antioxidantes (Zullo *et al.*, 2016; Pereira, 2015; Rodrigues-Cunha *et al.*, 2016). Isso indica que mesmo não havendo uma

melhora numérica na porcentagem de blastocistos, a adição de antioxidantes melhora as condições de meio e da qualidade dos embriões produzidos.

5. CONCLUSÃO

A menor concentração (2,5µg/mL) do antioxidante extraído do óleo de *Lippia origanoides* modulou a expressão gênica gerando uma menor quantidade de transcritos de PRDX-1 e demonstrando que seu efeito no meio de cultivo embrionário possa ser dose dependente.

Agradecimentos

Essa pesquisa contou com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), da Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA-Gado de leite).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, A.; DURAIRAJANAYAGAM, D.; DU PLESSIS, S. S. Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, v.12, p.112, 2014.

ARISTATILE, B.; AL-NUMAIR, K. S.; VEERAMANI, C. Protective effect of carvacrol on oxidative stress and cellular DNA damage induced by UVB irradiation in human peripheral lymphocytes. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, p.1-11, 2010.

CAO, C.; LENG, Y.; KUFU, D. Catalase activity is regulated by c-Abl and Arg in the oxidative stress response. *J. Biol. Chem.*, v.278, p.67-75, 2003.

COX, A. G.; WINTERBOURN, C. C.; HAMPTON, M. B. Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defense and redox signaling. *Biochem. J.*, v.425, p.313-325, 2010.

- DA SILVA, A. P.; SILVA, N. F.; ANDRADE, E. H. A.; et al. Tyrosinase inhibitory activity, molecular docking studies and antioxidant potential of chemotypes of *Lippia origanoides* (Verbenaceae) essential oils. *PLoS ONE*, v.12, n.5, p.1-17, 2017.
- HALL, A.; KARPLUS, P. A.; POOLE, L. B. Typical 2Cys Peroxiredoxins: Structures, mechanisms and functions. *FEBS J.*, v.276, n.9, p.2469-2477, 2009.
- HITCHLER, M. J.; DOMANN, F. E. An epigenetic perspective on the free radical theory of development. *Free Radic. Biol. Med.*, v.43, p.1023-36, 2007.
- HOFMANN, B.; HECHT, H. J.; FLOHÉ, L. Peroxiredoxins. *Biol. Chem.*, v.383, p.347-364, 2002.
- HORVÁTHOVÁ, E.; SRAMKOVA, M.; LABAJ, J.; et al. Study of cytotoxic, genotoxic and DNA-protective effects of selected components of essential oils on human leukemic cells K562. *Neoplasma*, v.54, p.478-483, 2007.
- LEYENS, G.; KNOOPS, B.; DONNAY, I. Expression of Peroxiredoxins in Bovine Oocytes and Embryos Produced *In Vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, v.69, p.243–251, 2004.
- LEUTENEGGER, C. M.; ALLUWAIMIB, A. M.; SMITHC, W. L.; et al. Quantization of bovine cytokine mRNA in milk cells of healthy cattle by real-time TaqMan® polymerase chain reaction. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.77, p.275-287, 2000.
- NEUMANN, C. A.; CAO, J.; MANEVICH, Y. Peroxiredoxin 1 and its role in cell signaling. *Cell Cycle*, v.24, p.4072-4078, 2009.
- NOSTRO, A.; PAPALIA, T. Antimicrobial activity of carvacrol: Current Progress and future prospective. *Recent. Pat. Antiinfect. Drug. Discov.*, v.7, p.28-35, 2012.
- PARRISH, J. J.; PARRISH, J. L.; FIRST, N. L. Effect of swim-up separation and heparin pre treatment of frozen-thawed spermatozoa on *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Bio. Reprod.*, v.30, n.1, p.112, 1984.
- PEREIRA, E. C. M. Produção de oócitos e embriões bubalinos: efeitos da época do ano e da adição de óleo essencial de *Lippia origanoides* na maturação *in vitro*. 2015. 128f. Tese de Doutorado Biotecnologia Animal da FMVZ – UNESP – Botucatu.

PFAFF, M.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.*, v.30, p.36, 2002.

RODRIGUES-CUNHA, M. C.; MESQUITA, L. G.; BRESSAN, F.; et al. Effects of melatonin during IVM in defined medium on oocyte meiosis, oxidative stress, and subsequent embryo development. *Theriogenology*, v.86, p.1685-1694, 2016.

SARRAZIN, S. L. F.; DA SILVA, L. A.; OLIVEIRA, R. B.; et al. Antibacterial action against food-borne microorganisms and antioxidant activity of carvacrol-rich oil from *Lippia origanoides* Kunth. *Lipids Health Dis.*, v.14, p.145, 2015.

SENEDA, M. M.; ESPER, C. R.; GARCIA, J. M.; et al. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Anim. Reprod. Sci.*, v.67, p.37-43, 2001.

SOLLECITO, N. V.; PEREIRA, E. C. M.; GRAZIA, J. G. V.; et al. Antioxidant activity of essential oil obtained from *Lippia origanoides* improves the quality of bovine embryos produced *in vitro*. *Arq. Bras. Med. Zootec.*, 2018 (*in press*).

SIRVENT, A.; BENISTANT, C.; ROCHE, S. Cytoplasmic signaling by the c-Abl tyrosine kinase in normal and cancer cells. *Biol. Cell*, v.100, p.617-631, 2008.

SLAMENOVA, D.; HORVATHOVA, E.; SRAMKOVA, M.; et al. DNA-protective effects of two components of essential plant oils carvacrol and thymol on mammalian cells cultured *in vitro*. *Neoplasma*, v.54, p.108-112, 2007.

STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. IETS 1998; 112-13, Illinois.

UFER, C.; WANG, C. C. The roles of glutathione peroxidases during embryo development. *Front. Mol. Neurosci.*, v.4, p.1-14, 2011.

VAN WAGTENDONK-DELEEUW, A. M.; MULLAART, E.; DE ROOS, A. P.; et al. Effects of different reproduction techniques: AI, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology*, v.53, p.575-97, 2000.

VIANA, J. H. M.; FIGUEIREDO, A. C. S.; SIQUEIRA, L. G. B. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. *Anim. Reprod.*, v.14, n.3, p.476-81, 2017.

ZULLO, G.; ALBERO, G.; NEGLIA, G.; et al. L-ergothioneine supplementation during culture improves quality of bovine *in vitro*-produced embryos. *Theriogenology*, v.85, p.688-97, 2016.

WANG, L.; ZHANG, H.; WANG, Y.; et al. Peroxiredoxin 5 is essential for *in vitro* development of bovine SCNT embryos. *Theriogenology*, v.92, p.156-166, 2017.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta pesquisa teve como objetivo geral, avaliar o efeito antioxidante do óleo extraído da *Lippia origanoides* adicionado ao meio de cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro*. No Capítulo 1 foram encontrados baixos índices apoptóticos para os embriões cultivados em meios que continham o extrato oleoso de *Lippia origanoides*. Os tratamentos que induziram à menor taxa de apoptose continham maior proporção de mitocôndrias e menor vacuolização citoplasmática, avaliadas por meio da morfometria celular, descrita no Capítulo 2. Além disso, os resultados do Capítulo 3 indicaram que os tratamentos suplementados com *Lippia origanoides* apresentaram diferenças na expressão da enzima antioxidante PRDX-1, uma importante enzima antioxidante capaz de reduzir o peróxido de hidrogênio.

Os resultados obtidos nos diferentes estudos dessa tese sugerem que os compostos presentes no extrato oleoso de *Lippia origanoides* não influenciam diretamente nas taxas de produção total de embriões, porém, podem agir em etapas que incrementam a qualidade das células embrionárias. As modificações observadas sugerem que as mesmas podem ocorrer tanto no âmbito molecular, com variações na expressão de genes ligados à proteção celular contra os danos causados pelo estresse oxidativo, bem como na morfologia celular, alterando a conformação e funcionalidade de organelas importantes para a manutenção da integridade e viabilidade das células embrionárias. A alteração morfofuncional dessas organelas pode sinalizar o início do processo de apoptose. Como a qualidade embrionária é fundamental para o sucesso da PIVE, embriões com baixas taxas de apoptose têm melhor qualidade, pois terão maior número de células viáveis que os auxiliarão na fase de pós-implantação dos embriões transferidos ou criopreservados.

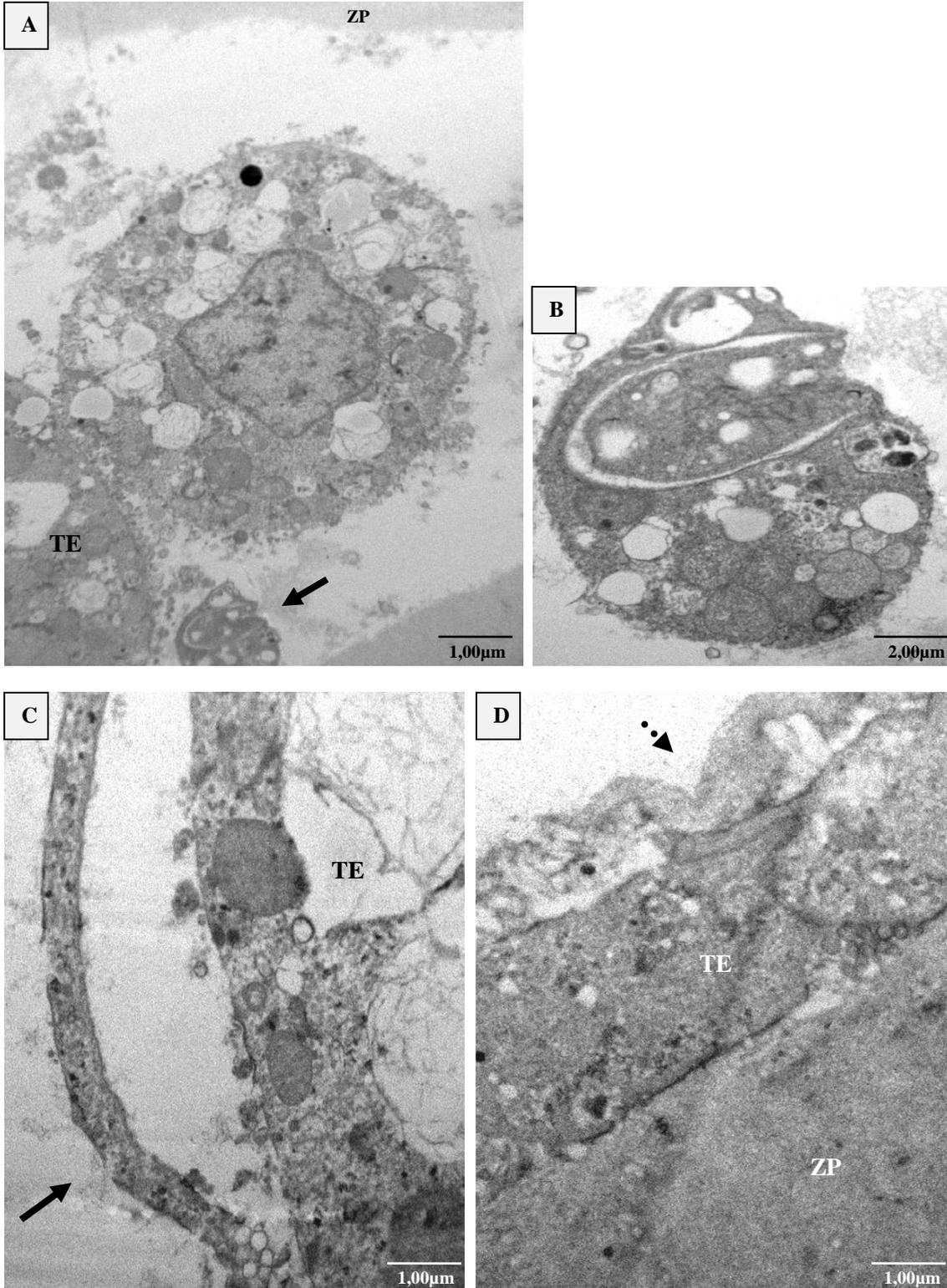
Apesar da variação de resultados, os tratamentos com diferentes concentrações do extrato oleoso de *Lippia origanoides* se destacaram. A grande limitação do uso rotineiro de óleo *Lippia* na produção *in vitro* de embriões está na variabilidade da composição química, que ainda impede que seja criado um produto comercial com padrão conhecido dos percentuais de Timol e Carvacrol, de determinada partida, o que dificulta seu uso em maior escala, além da variabilidade nos resultados de produção *in vitro* de embriões.

São necessários mais estudos, a fim de se descobrir um modelo para o uso do óleo na produção *in vitro* de embriões bovinos, com condições de cultivo pré-determinadas. Além disso, outros testes para avaliação da qualidade embrionária ainda carecem de ser

realizados a fim de explorar e descobrir todo o potencial da suplementação deste extrato oleoso no meio de cultivo *in vitro*.

ANEXO 1

No presente estudo, ao realizar a análise morfométrica das células embrionárias, outros achados microscópicos também foram observados.



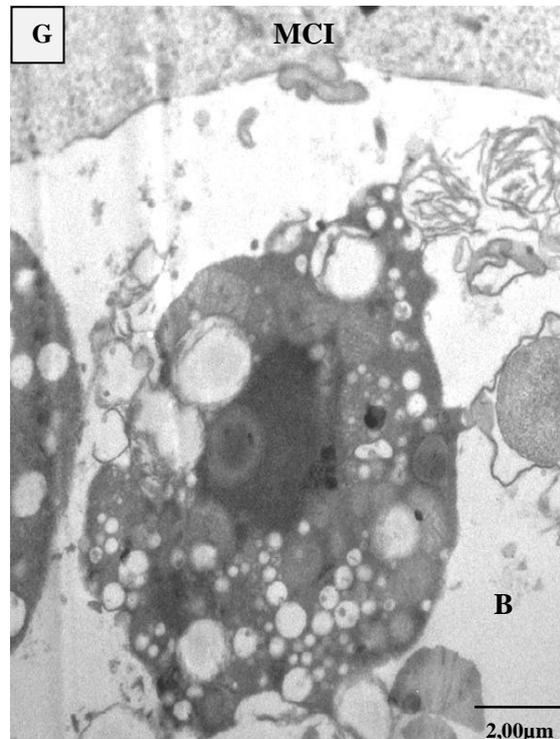
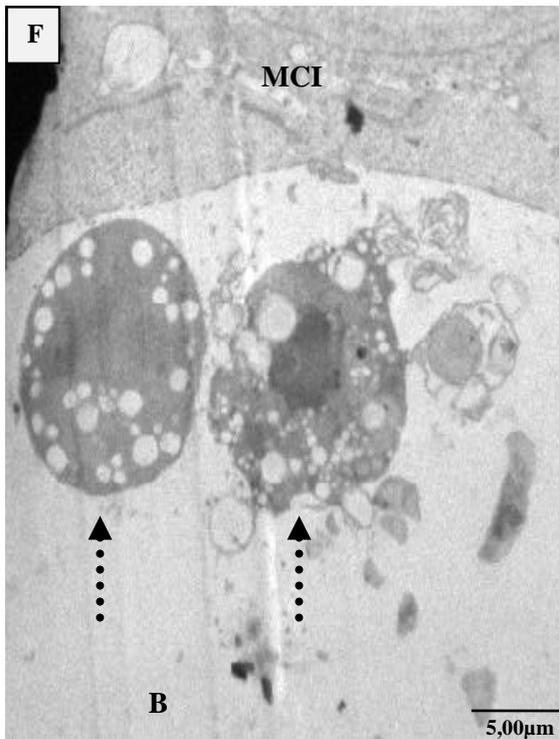
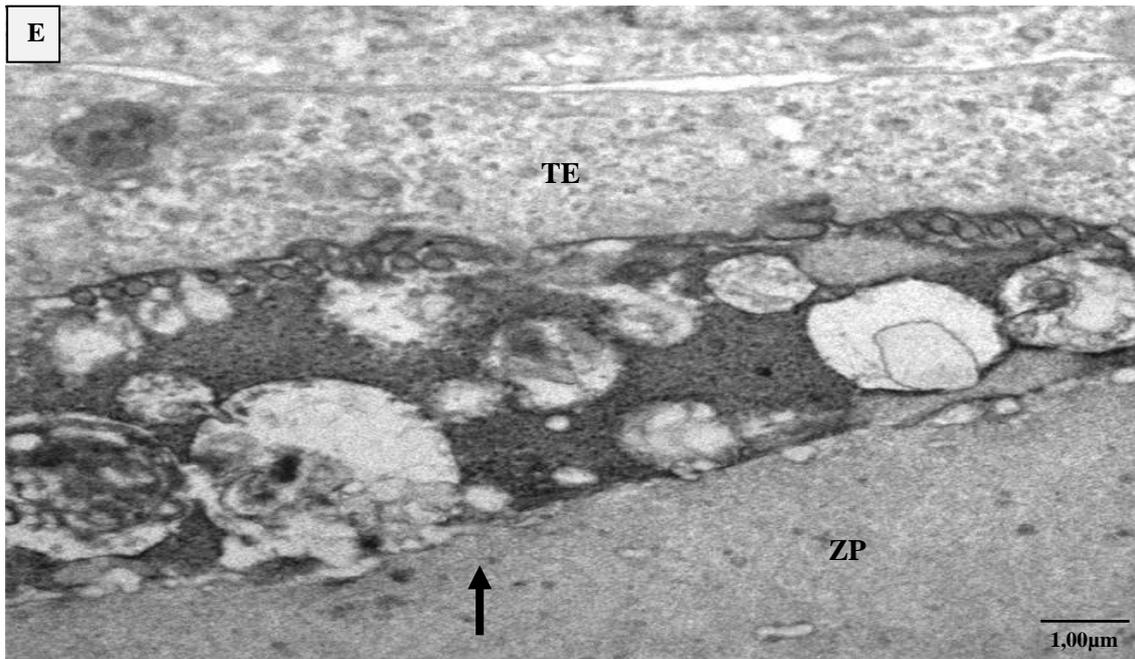


Figura 1. Blastocisto bovino. Eletromicrografia de achados microscópicos. As estruturas apontadas pelas setas foram encontradas no espaço entre o Trofoectoderma (TE) e a Zona Pelúcida (ZP), que estavam presentes no Tratamento 1* (A, B –em maior aumento - e C) e no tratamento 3 (E). Já as setas pontilhadas mostram as projeções celulares observadas na cavidade da Blastocèle (B) e adjacentes a Massa Celular Interna (MCI) dos embriões cultivados no tratamento 1 (D) e no tratamento 5 (F) com uma das estruturas sendo mostrada com mais detalhes (G).

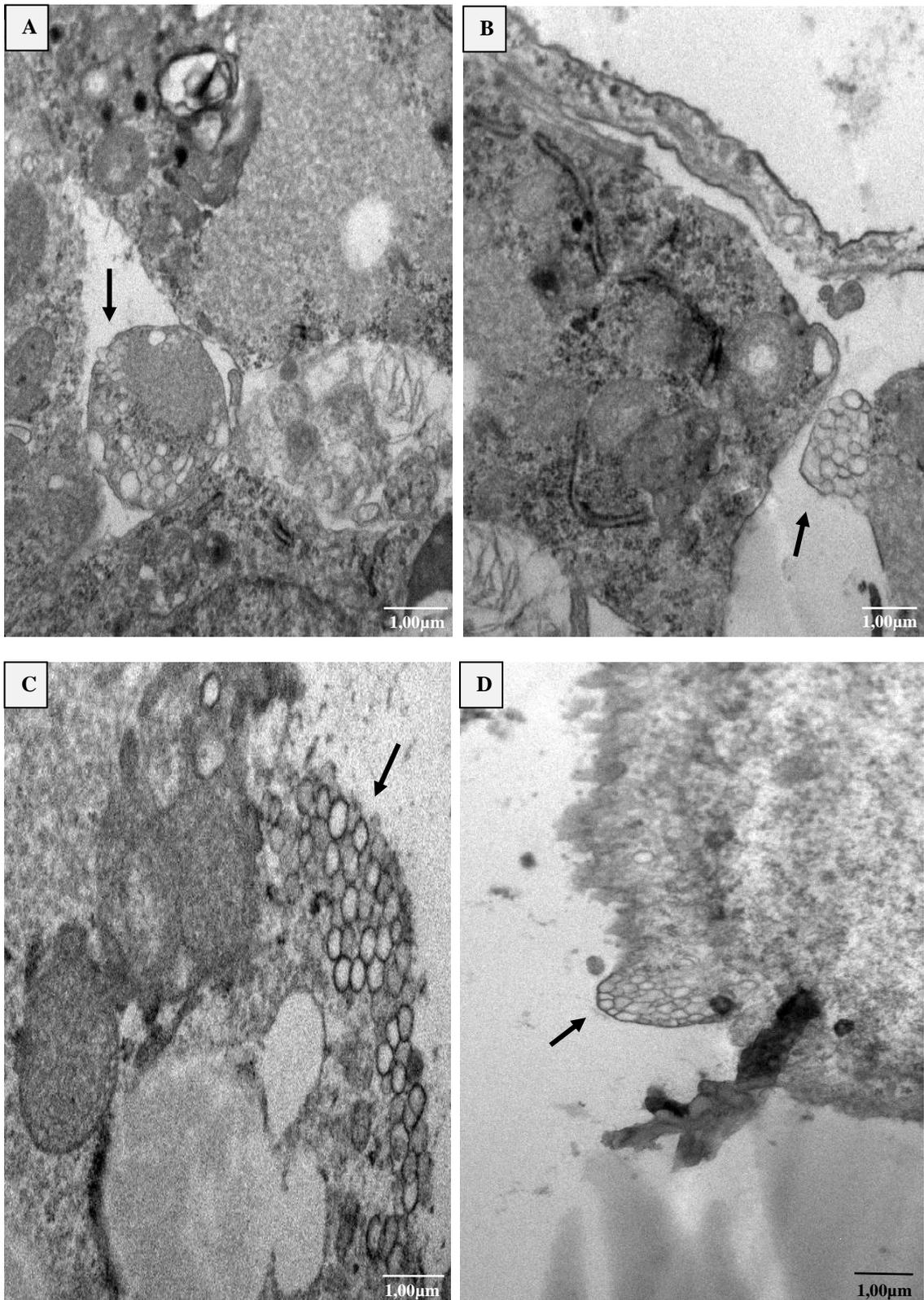
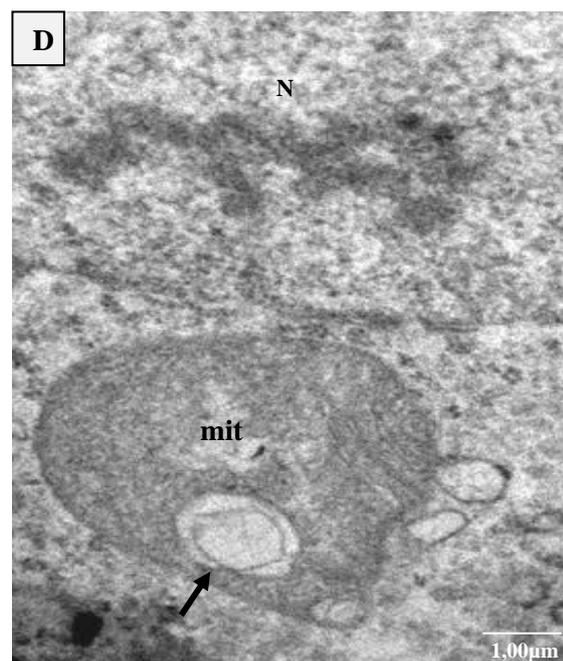
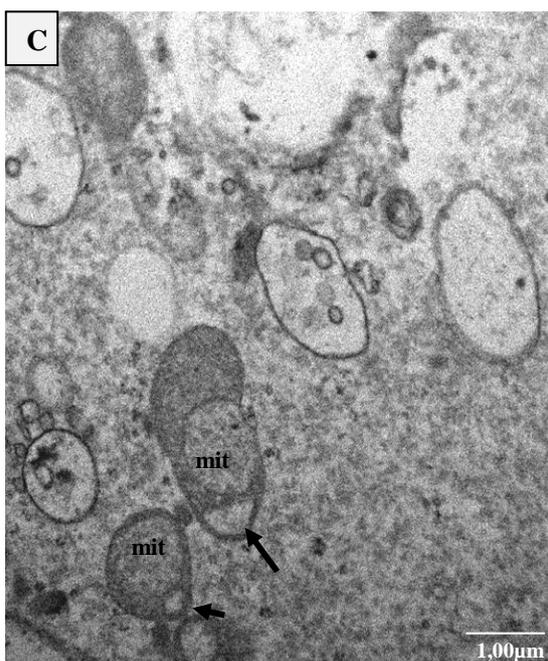
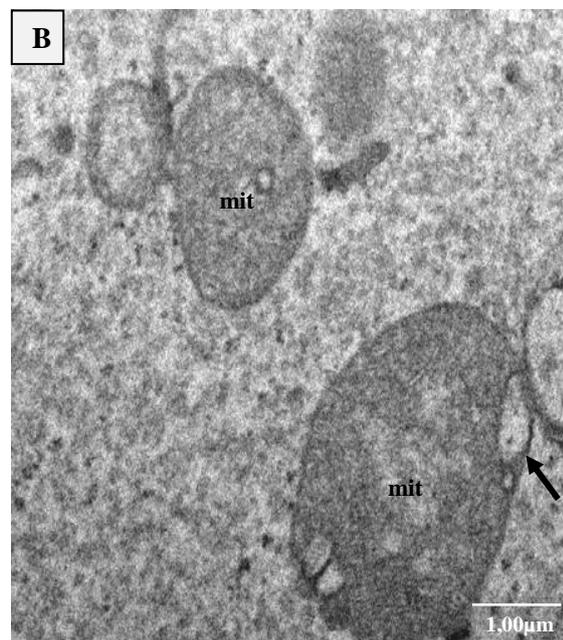
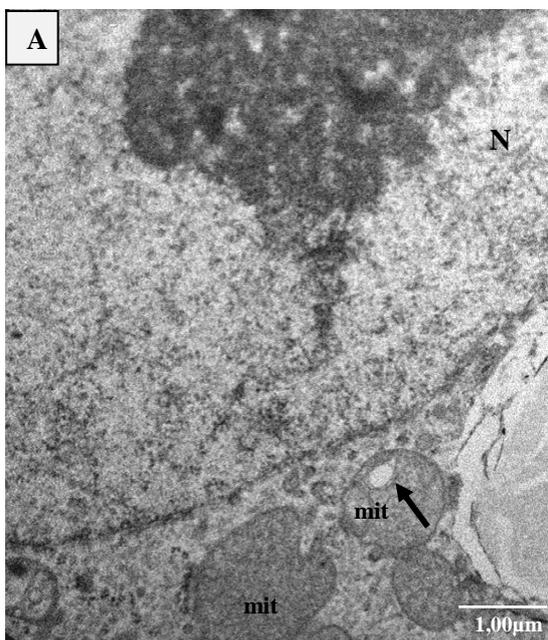


Figura 2. Blastocisto bovino. Eletromicrografia de células de blastocistos produzidos *in vitro*. Presença de estruturas em forma de bolhas, em várias regiões das células embrionárias. As imagens mostram embriões obtidos no tratamento 1 (A e B), tratamento 2 (C) e tratamento 5 (D). Segundo Ghadially (1988), trata-se de bolhas

citoplasmáticas que ocorrem tanto *in vivo* quanto *in vitro*, em células normais ou malignas e mais frequentemente na mitose que na interfase. Essas alterações podem ser induzidas por vários tipos de agentes como drogas, produtos químicos, alta pressão hidrostática ou por uma infecção viral. As bolhas citoplasmáticas podem ser compostas por uma membrana simples ou dupla, sendo subdivididas em bolhas solitárias, bolhas multiloculadas, que provavelmente se formam pela justaposição de bolhas solitárias, e bolhas concêntricas que se formam uma dentro da outra. São projeções que se desenvolvem na superfície celular e seu conteúdo é composto por um líquido transparente e floculento.



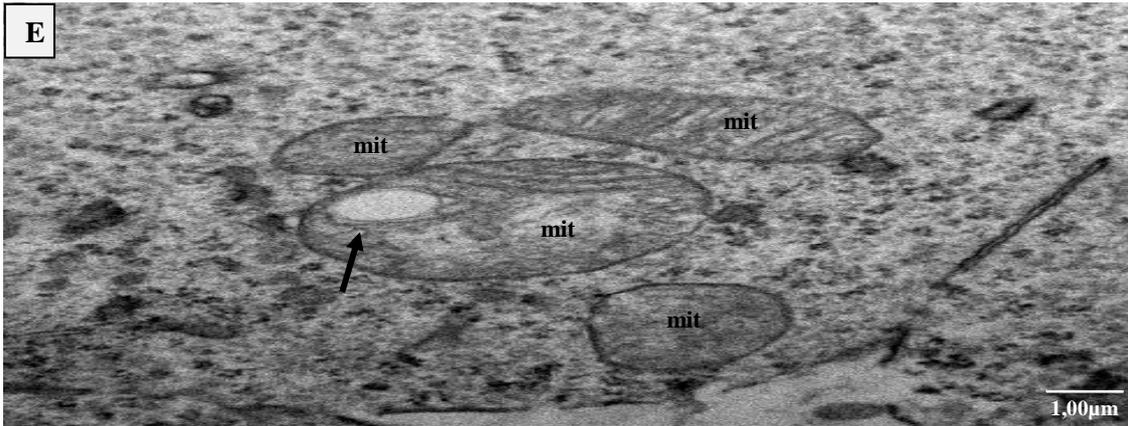
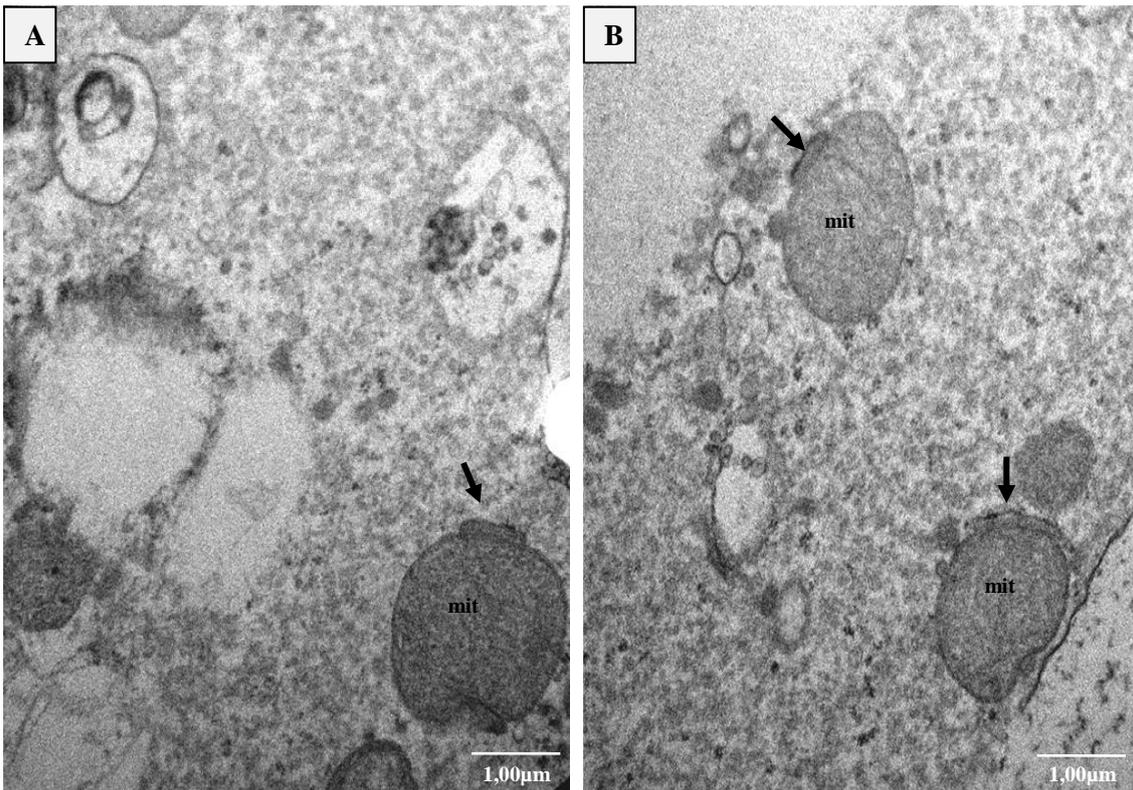
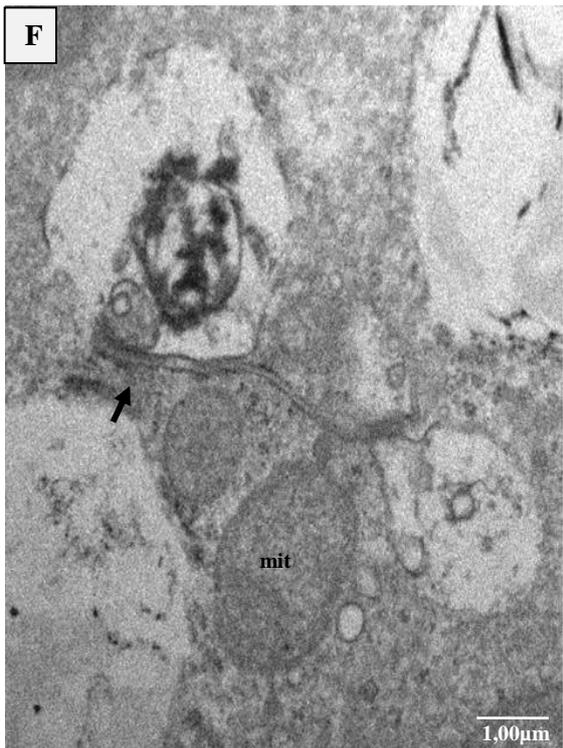
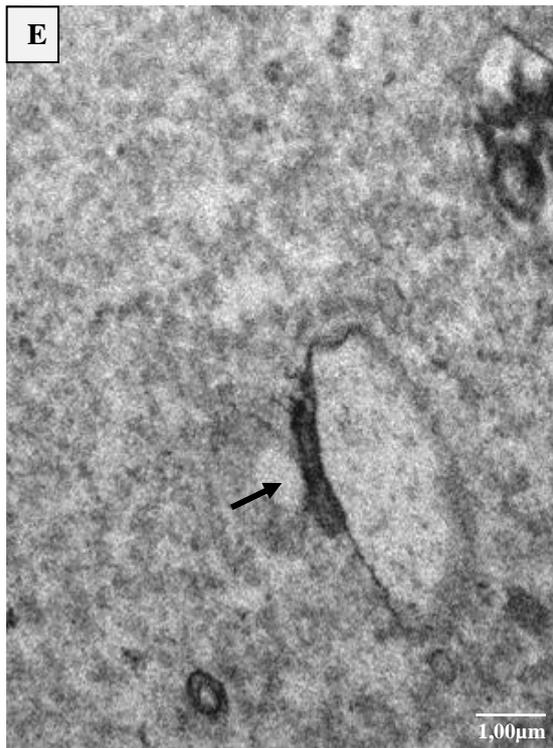
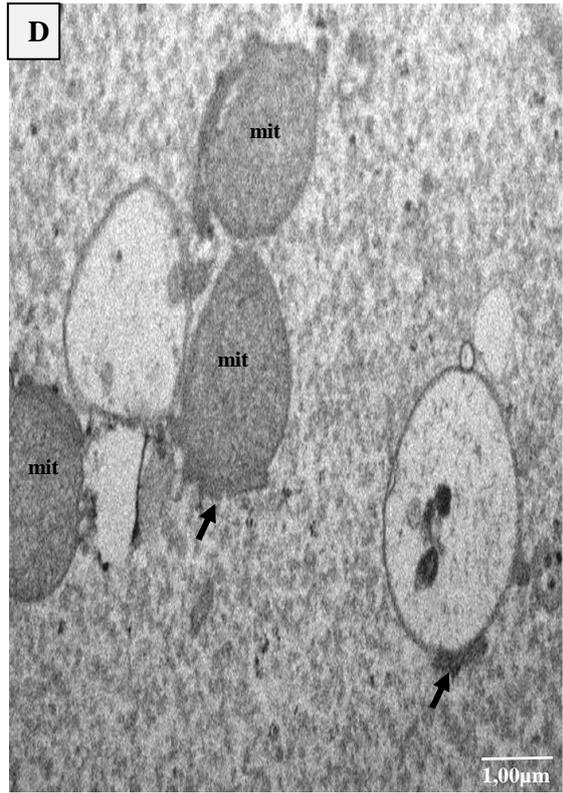
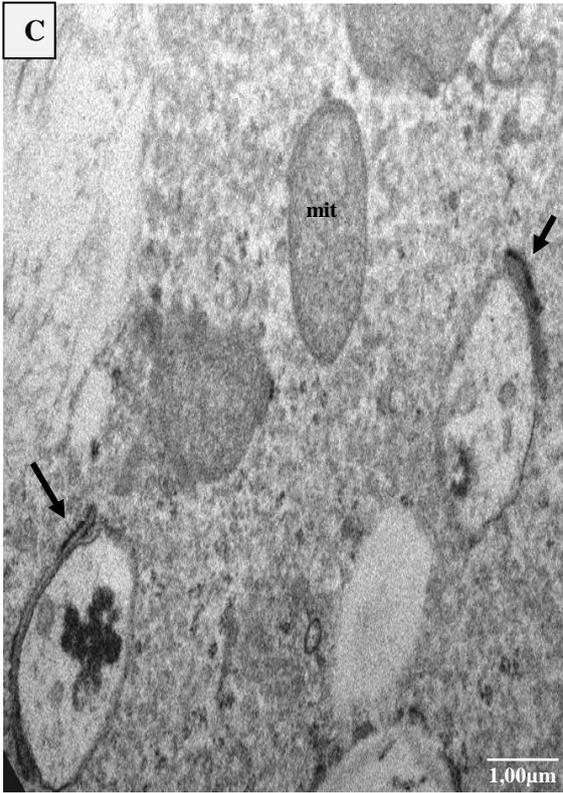


Figura 3. Blastocisto bovino. Eletromicrografias de mitocôndrias (**mit**) apresentando o processo de vacuolização interna. Figuras **A**, **B** e **C**, correspondem as mitocôndrias do tratamento 2. As figuras **D** e **E**, são mitocôndrias presentes nos embriões cultivados no tratamento 5. A vacuolização mitocondrial é um indício de degeneração que ocorre como consequência de alguma alteração externa.





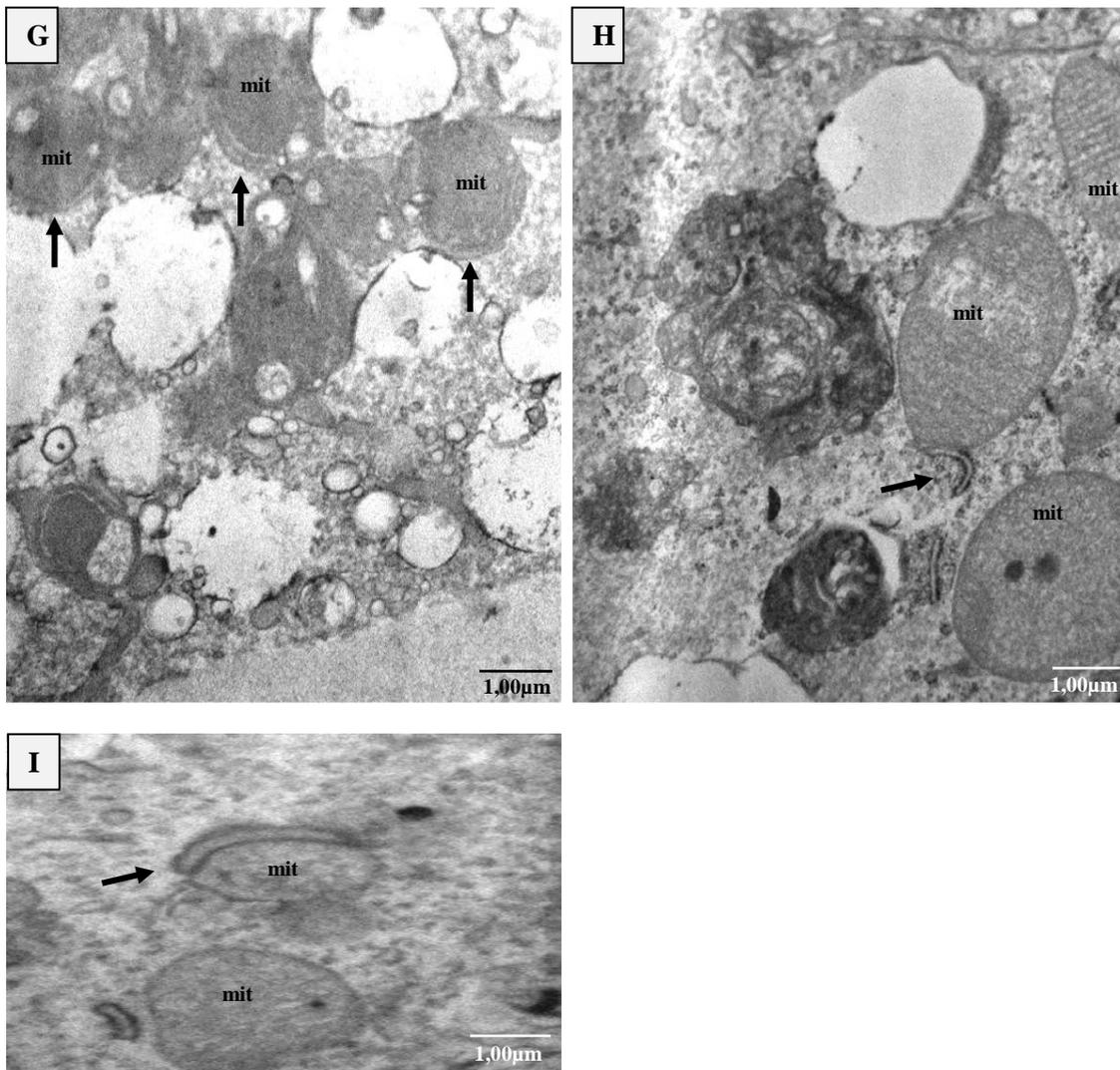


Figura 4. Blastocisto bovino. Eletromicrografia evidenciando o processo de autofagocitose no citoplasma de células embrionárias. Nas figuras de **A a F** , é possível ver o início da autofagocitose (setas) de mitocôndrias do tratamento 2, enquanto a figura **G**) corresponde a autofagocitose no tratamento 4 e as **H e I**) no tratamento 5. A célula elimina organelas envelhecidas por um mecanismo denominado autofagia, que inclui a formação de autofagossomos. Os autofagossomos se formam com a ajuda do Retículo Endoplasmático que fornece uma porção de sua membrana na forma de vesícula para envolver a organela obsoleta e formar o autofagossomo. Em seguida, o autofagossomo funde-se com um endossomo secundário, o qual recebe enzimas hidrolíticas do Complexo de Golgi e se converte em fagolisossomo. O processo culmina com a degradação da organela por parte dessas enzimas.

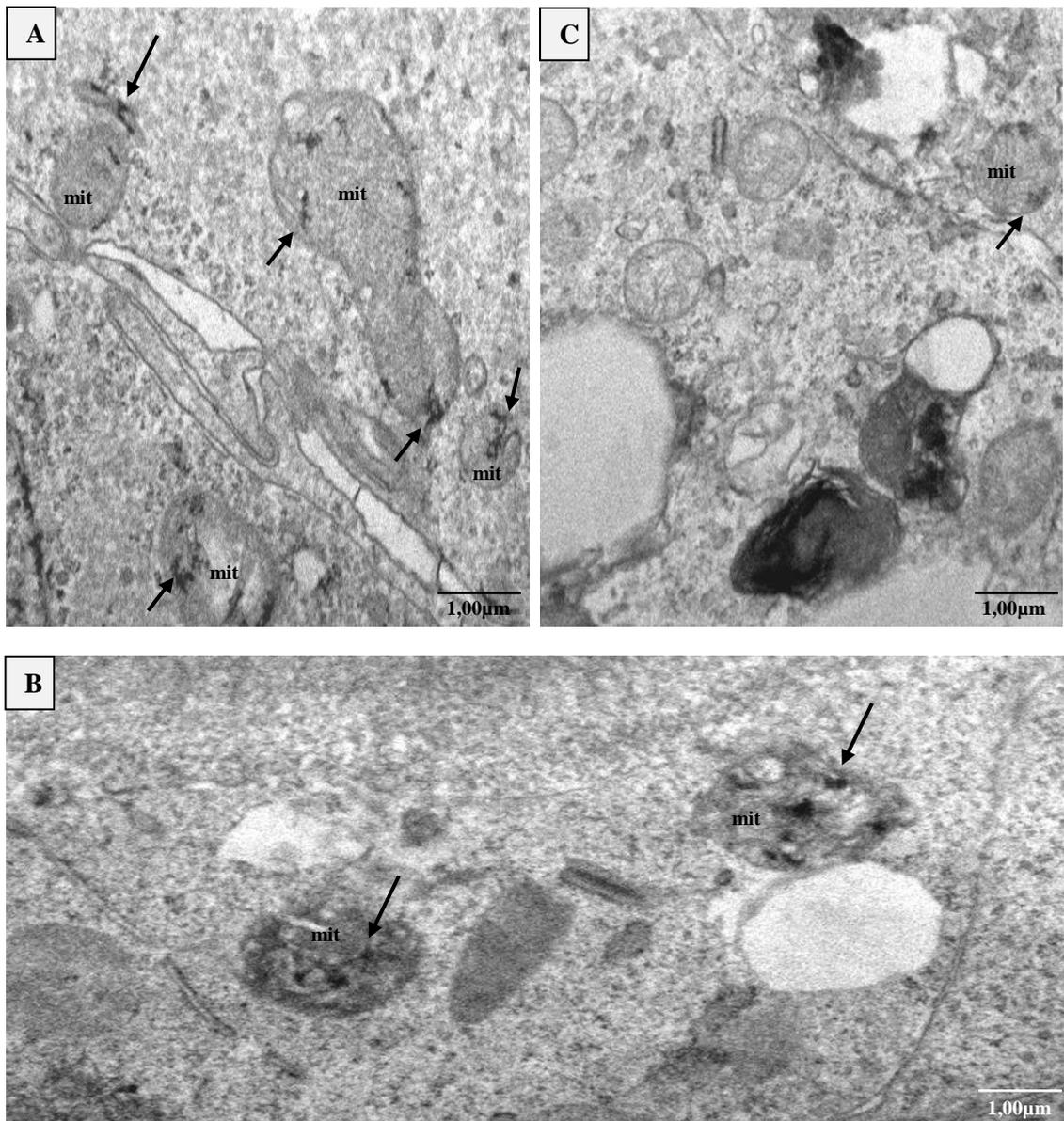


Figura 5. Blastocistos bovinos. Eletromicrografia de **A)** mitocôndrias encontradas nos embriões cultivados no Tratamento 3, **B)** as pertencentes ao Tratamento 4 e **C)** oriundas do Tratamento 5. Essa mitocôndrias apresentavam corpos mais eletrôn-densos em sua matriz, que são indicativos de agregados que se formam na matriz mitocondrial no início de sua degeneração com subsequente autofagocitose. Após o aparecimento desses agregados ocorre o envolvimento da organela pelo Retículo Endoplasmático que formará uma vesícula que dará origem ao futuro fagossomo (Zhou *et al.*, 2016).

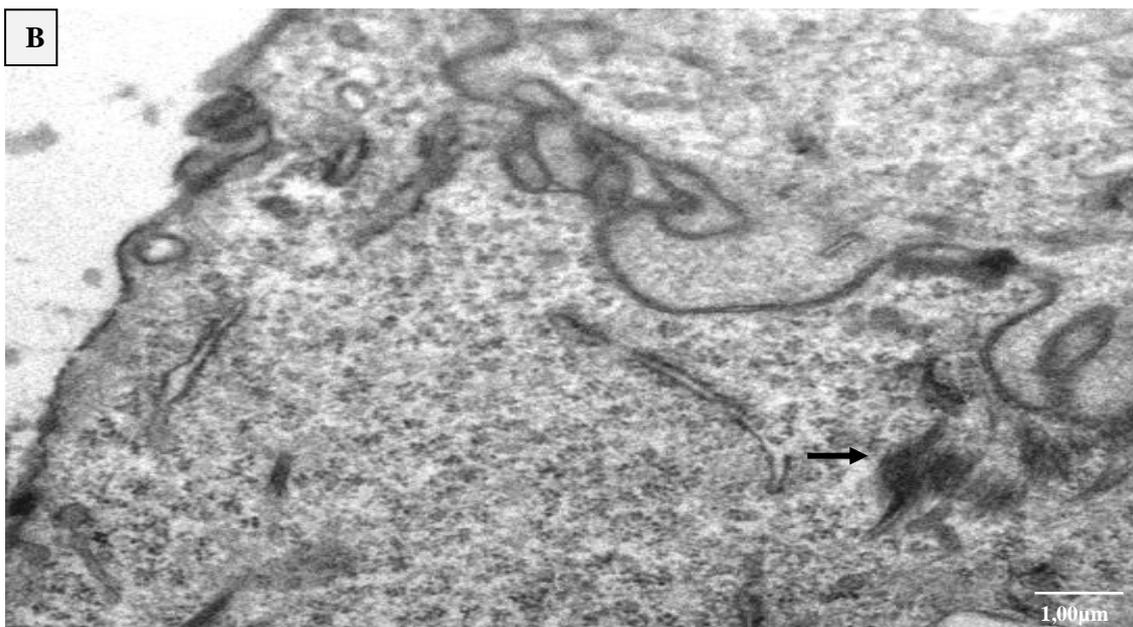
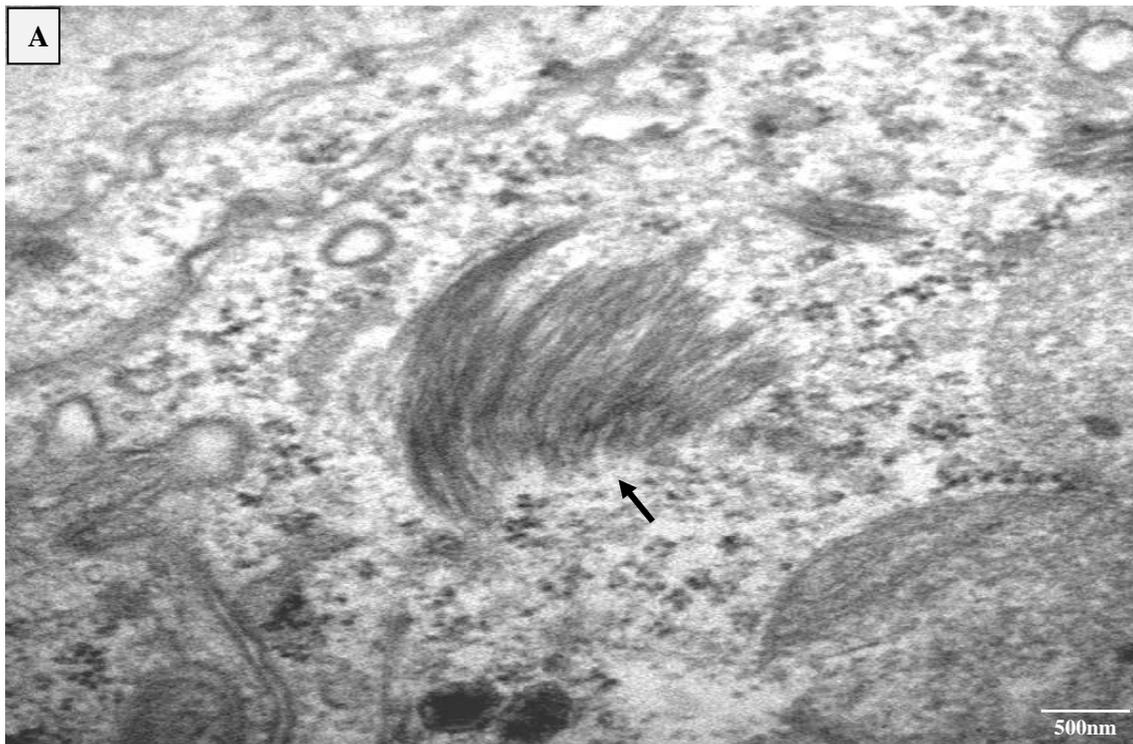


Figura 6. Blastocisto bovino. Eletromicrografia de feixe de filamentos intermediários ou tonofilamentos nas células do Trofooctoderma (**TE**) do tratamento 4 (**A**) e 5 (**B**). Esses tonofilamentos foram encontrados em pequenas quantidades nos blastocistos do presente estudo. É comum, em um estágio mais avançado de desenvolvimento embrionário, observar um aumento dessas estruturas principalmente próximas aos desmossomos. De modo geral desempenham papel importante no processo de eclosão, ao contrair seus feixes como um esfíncter e possibilitar a saída do embrião do envoltório que o protegia até então, a zona pelúcida (Sathananthan *et al.* 2003).

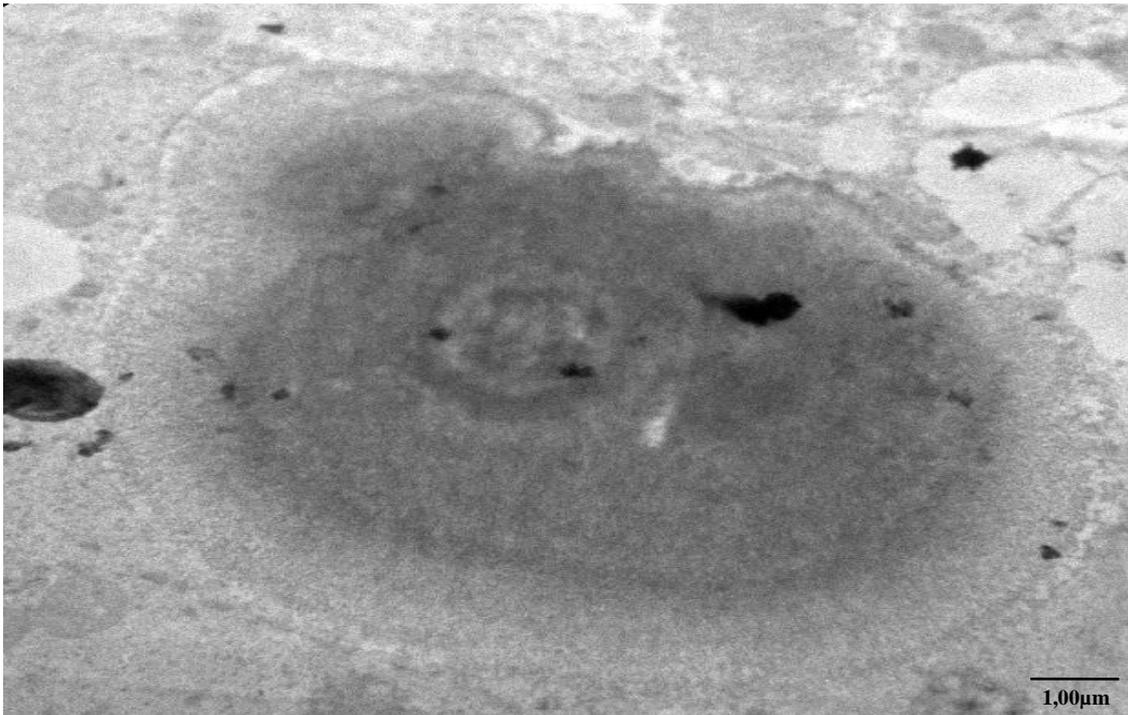
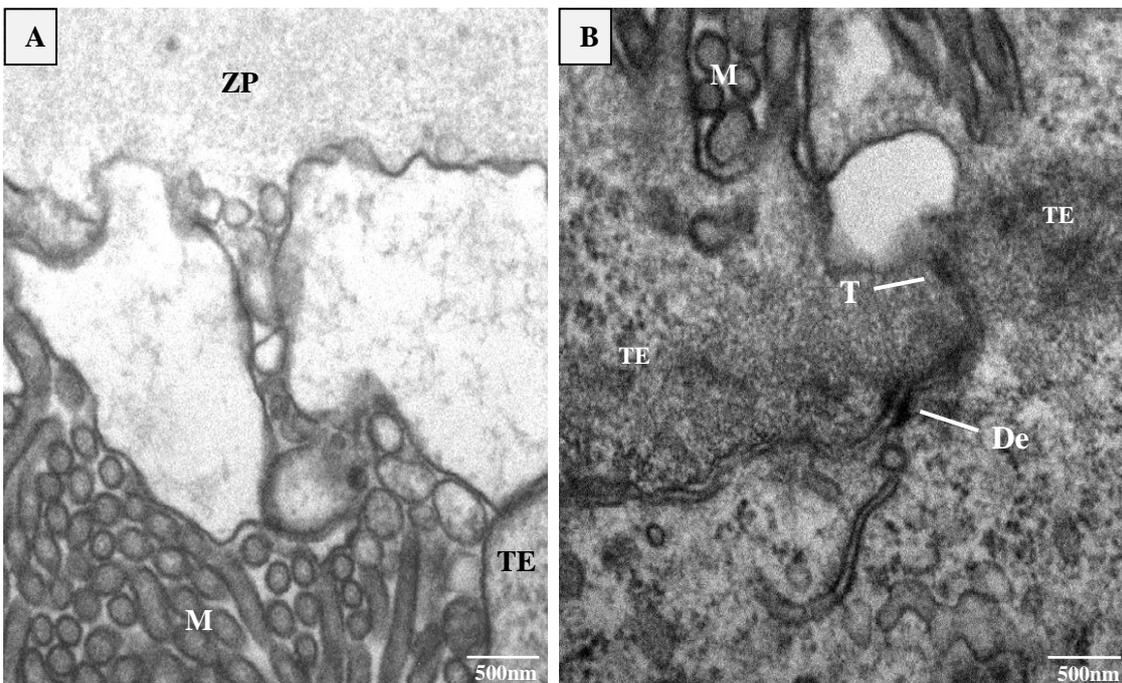


Figura 7. Blastocisto bovino. Eletromicrografia retratando um possível processo inicial de calcificação das células do embrião bovino cultivados no Tratamento 4. As lâminas mais eletron-densas representam zonas de deposição máxima de cálcio. Quadros de calcificação tem início por meio da deposição de calcio em vacúolos de grande diâmetro e que possuem em seu interior detritos celulares.



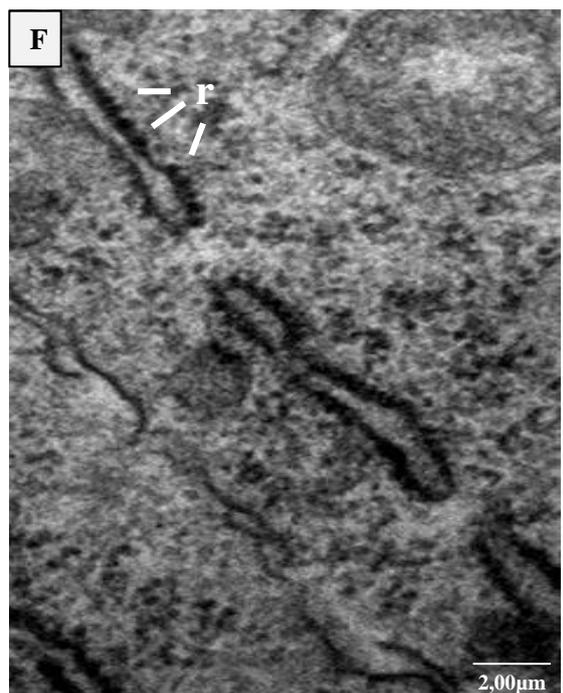
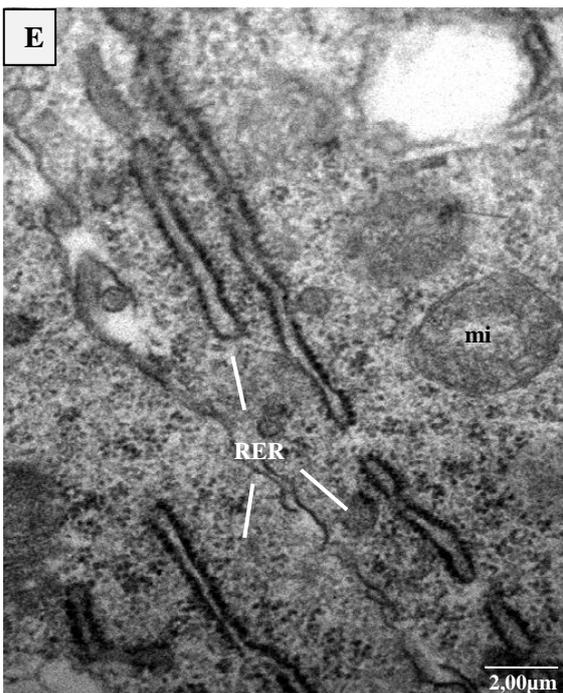
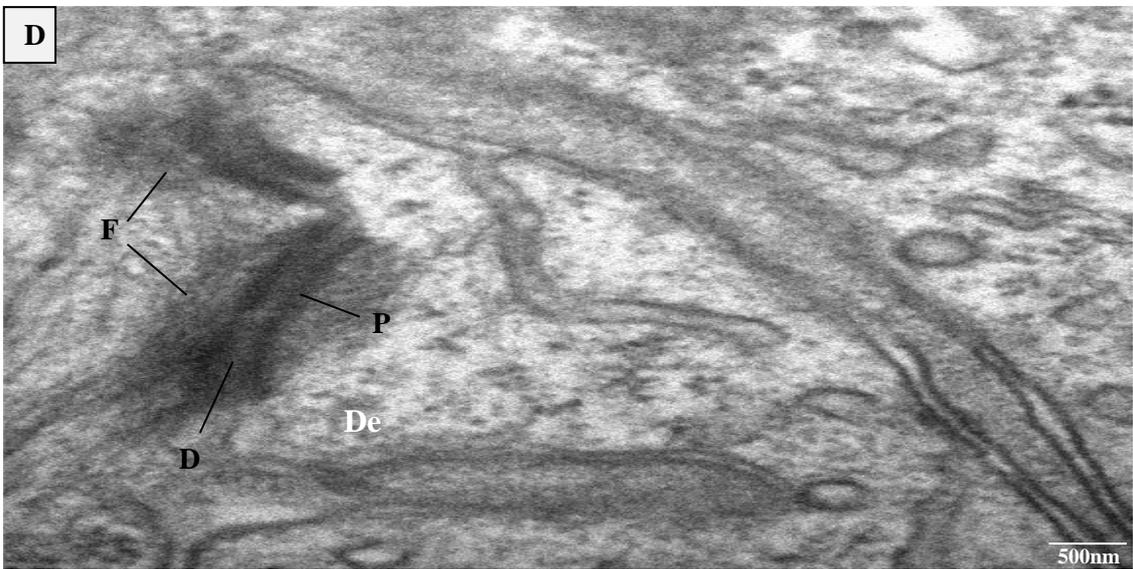
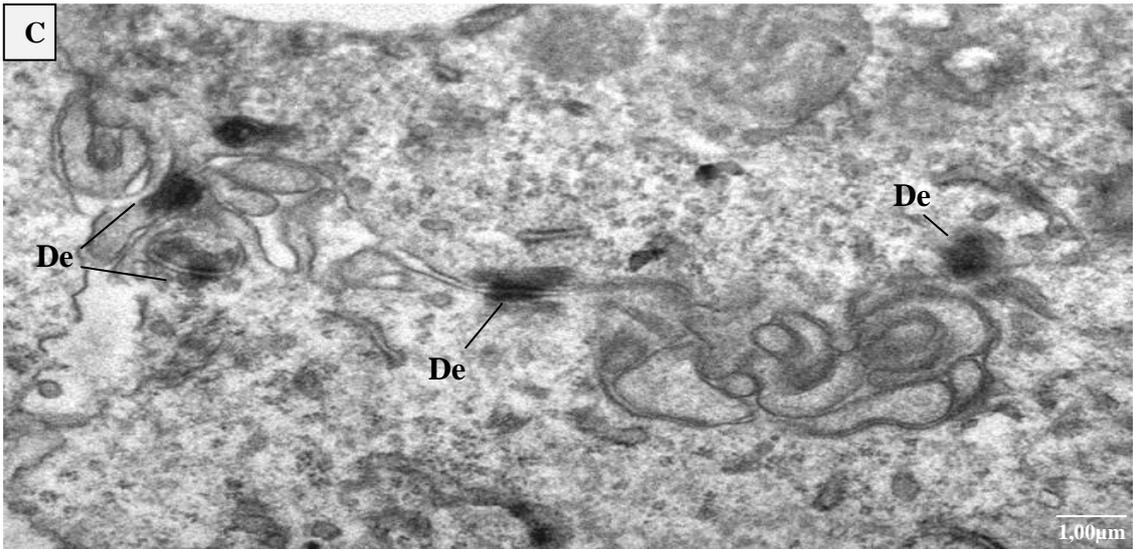


Figura 8. Blastocisto bovino. Eletromicrografias que apresentam em destaque estruturas que compõe as células de embriões produzidos *in vitro* no estágio de blastocisto. **A)** Microvilosidades (**M**) pertencentes as células do Trofoectoderma (**TE**) fazendo conexão com as superfície da Zona Pelúcida (**ZP**) e aumentando a superfície celular auxiliando na absorção. **B)** É possível observar dois tipos de Conexões entre as células do Trofoectoderma (**TE**). Na região superior próximo as microvilosidades (**M**) estão as conexões do tipo *Tight Junctions* (**T**) que além de unir as células e de impedir a passagem de substâncias através do trofoectoderma, determinam que as composições moleculares das regiões apical e basolateral sejam diferentes entre si, o que é determinante para a cavitação e formação da blastocele no embrião. Mais abaixo está outro tipo de conexão conhecida como Desmossomos (**De**). **C)** O limite entre duas células do Trofoectoderma no qual observa-se ao longo do espaço intercelular vários Desmossomos (**De**) fazendo a junção puntiforme entre elas e conferindo uma grande resistência mecânica ao embrião. **D)** A morfologia da composição de um Desmossomo em detalhes, com a placa (**P**), os Filamentos (**F**) e as Linhas Densas (**D**) no espaço intercelular. **E)** Retículo Endoplasmático Rugoso (**RER**) **F)** Ribossomos (**r**) aderidos a membrana plasmática do Retículo Endoplasmático em detalhes.

* As imagens obtidas em microscópio eletrônico de transmissão (Modelo HT7700) retratam os cortes efetuados em embriões produzidos *in vitro* no estágio de Blastocisto (BI). Esses embriões foram cultivados em meio SOFm e distribuído em 5 tratamentos: Tratamento 1 (**T1**) - sem adição de antioxidantes, Tratamento 2 (**T2**) - com adição de 50µM/mL do antioxidante Cisteamina, Tratamento 3 (**T3**) - adição de 2,5µg/mL do antioxidante derivado do extrato oleoso de *Lippia origanoides*, Tratamento 4 (**T4**) - adição de 5,0µg/mL do antioxidante derivado do extrato oleoso de *Lippia origanoides* e Tratamento 5 (**T5**) - adição de 10,0µg/mL do antioxidante derivado do extrato oleoso de *Lippia origanoides*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Ghadially FN. Ultrastructural Morphology of the cell and matrix. Third Edition, Volume 2. Butterworths, London. 1988.

Zhou, Q.; Li, H.; Li, H.; et al. Mitochondrial endonuclease G mediates breakdown of paternal mitochondria upon fertilization. *Science*, published online, 2016.

Sathananthan H. Mechanics of human blastocyst hatching *in vitro*. *Reprod. BioMed. Online*, v.7, n.2, p.228–234, 2003.

ANEXO 2



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solic

Protocolo CEUA: 339/2016

Título do projeto: Efeito da adição de antioxidantes e expressão genica de transportadores celulares de p glicose em embriões bovinos e bubalinos PIVE

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Alan Maia Borges

Unidade: Escola de Veterinaria

Departamento: Departamento de Clinica e Cirurgia Veterinaria

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 24/04/2017. Validade: 24/04/2017 à 24/04/2022

Belo Horizonte, 04/05/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005

ANEXO 3

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

Decision Letter (ABMVZ-2017-10323.R1)

From: ampinho.editor@gmail.com

To: nat.sol86@yahoo.com.br

CC:

Subject: Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia - Decision on Manuscript ID ABMVZ-2017-10323.R1

Body: 06-Dec-2017

Dear Dr. Sollecito:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Antioxidant activity of essential oil obtained from *Lippia origanoides* improves the quality of bovine embryos produced in vitro" in its current form for publication in the Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Dr. Antonio de Pinho Marques Jr

Editor-in-Chief, Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

ampinho.editor@gmail.com

Associate Editor

Comments to the Author:

(There are no comments.)

Entire Scoresheet:

Date Sent: 06-Dec-2017