



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA-UFRA

INSTITUTO DA SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL-ISPA

CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

HELDER RODRIGO DOS SANTOS LEMOS

**UTILIZAÇÃO DO SUPLEMENTO ANTIOXIDANTE AMORA MIURA (*Morus nigra*)
NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÃO BOVINO**

Belém

2019

HELDER RODRIGO DOS SANTOS LEMOS

**UTILIZAÇÃO DO SUPLEMENTO ANTIOXIDANTE AMORA MIURA (*Morus nigra*)
NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÃO BOVINO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para a obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária, do Instituto da Saúde e Produção Animal da Universidade Federal Rural da Amazônia.

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Tavares Rolim Filho

Belém
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Bibliotecas da Universidade Federal Rural da Amazônia
Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- L555u Lemos, Helder Rodrigo dos Santos
Utilização do Suplemento Antioxidante Amora Miúra (*Morus nigra*) na Produção in vitro de Embrião Bovino / Helder Rodrigo dos Santos Lemos. - 2019.
37 f.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso de Medicina Veterinária, Campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2019.
Orientador: Prof. Dr. Sebastião Tavares Rolim Filho
- I. Reprodução Animal. 2. Biotecnologia. 3. Produção in vitro de embrião. 4. Bovinocultura. I. Filho, Sebastião Tavares Rolim, *orient.* II. Título

CDD 636.20824

HELDER RODRIGO DOS SANTOS LEMOS

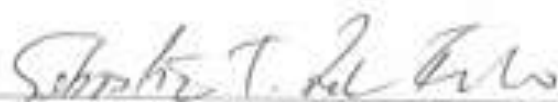
UTILIZAÇÃO DO SUPLEMENTO ANTIOXIDANTE AMORA MIURA (*Morus nigra*) NA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÃO BOVINO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para a obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária, do Instituto da Saúde e Produção Animal da Universidade Federal Rural de Amazônia. Área de concentração: Reprodução Animal.

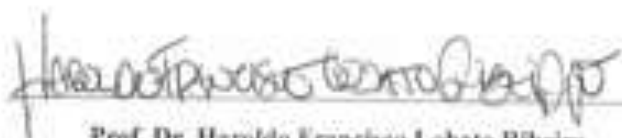
22 de novembro de 2019

Data de Aprovação

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Sebastião Tavares Rolim Filho



Prof. Dr. Haroldo Francisco Lobato Ribeiro

Anelise de Sargos Borges

Med. Vet. Anelise de Sargos Borges

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT – Catalases

CCO – Complexo Cumulus Oócito

CIV – Cultivo *in vitro*

CuZnSOD – Superóxido dismutase de cobre/zinco

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

EGF – Fator de Crescimento Epidérmico

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

FIV – Fertilização *in vitro*

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

GPX – Glutathione Peroxidase

GSH – Glutathione Reduzida

IA – Inseminação Artificial

IATF – Inseminação Artificial em Tempo Fixo

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ITS – insulina-transferrina-selênio

LH – Hormônio luteinizante

Mg – Miligrama

MIV – Maturação *in vitro*

ml – Mililitro

mm – Milímetro

OPU – Ovum *Pick Up*

PIVE – Produção *in vitro* de Embrião

SFB – Soro Fetal Bovino

SOD – Superóxido Dismutase

SOF – *Synthetic Oviductal Fluid*

Sptz – Espermatozoide

TCM – Tissue culture medium

TE – Transferência de Embrião

RESUMO

Produção *in vitro* de embrião é uma biotécnica recente que visa à obtenção de embriões fora do aparelho reprodutivo das fêmeas onde envolve três etapas biológicas: maturação *in vitro* de oócitos recuperados de folículos ovarianos, fecundação *in vitro* e o cultivo *in vitro*, etapa onde ocorre o desenvolvimento do zigoto até os estágios de blastocistos. O objetivo do trabalho foi avaliar o uso do suplemento Amora Miúra® em oócitos bovinos durante a maturação *in vitro* e suas consequências no desenvolvimento embrionário. Foram avaliadas as taxas de clivagem e formação de blastocistos nos dias 2 e 7 do desenvolvimento embrionário, respectivamente, com diferentes concentrações do suplemento. Os oócitos foram distribuídos entre os grupos experimentais: Grupo G1 com 70 oócitos (Meio de maturação *in vitro* com a adição de 0,5 mg/ml de amora); Grupo G2 com 68 oócitos (Meio de MIV com adição de 0,25 mg/ml de amora); e Grupo Controle G3 com 65 oócitos (Meio de MIV com adição de β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich), melatonina (Sigma-Aldrich) e insulina-transferrina-selênio (ITS) (Gibco Life Technology – concentrado 100 vezes), onde foram levados e processados no Laboratório de Fecundação *in vitro* do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará num período de 12 dias cada processo durante três meses. As análises das taxas de clivagem e de produção de embrião demonstraram através da Análise de Variância que não houve diferença significativa entre os grupos com diferentes concentrações do suplemento de extrato de amora-miúra ($p>0,05$), porém demonstrando ser um meio alternativo de molécula antioxidante utilizado na Produção *in vitro* de Embrião por ser um suplemento alimentar comercial acessível e de custo não elevado, chegando em torno de 3% do valor dos meios utilizados na rotina do laboratório. Os antioxidantes presentes no grupo G1 e G2 participam das mesmas vias dos antioxidantes presentes no grupo controle positivo (G3), o que pode explicar os resultados parecidos, mostrando que eles participam da redução do estresse oxidativo das estruturas celulares sugerindo bloqueio de radicais livres.

Palavras-chave: Amora-miúra – Embriões – Maturação *in vitro*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Produção <i>in vitro</i> de Embrião.....	3
2.2. Espécies Reativas de Oxigênio.....	6
2.3. Agentes Antioxidantes.....	7
2.3.1. Selênio.....	8
2.3.2. Vitamina C	8
2.3.3. Zinco	9
2.4. <i>Amora Miúra (Morus nigra)</i>	9
3. OBJETIVOS	11
3.1. Objetivo Geral	11
3.2. Objetivos Específicos.....	11
4. METODOLOGIA.....	11
4.1. Delineamento Experimental	12
4.2. Obtenção dos Ovários	12
4.3. Recuperação e Seleção dos Complexos Cúmulos-oócitos	12
4.4. Maturação <i>in Vitro</i> (MIV).....	13
4.5. Fecundação <i>in Vitro</i> (FIV).....	13
4.6. Cultivo <i>in Vitro</i> (CIV) dos Embriões.....	14
4.7. Análises Quantitativa do Desenvolvimento Embrionário	14
4.8. Análise Estatística	14
5. RESULTADOS	15
6. DISCUSSÃO	16
7. CONCLUSÃO.....	19
REFERÊNCIAS	20

1. INTRODUÇÃO

De acordo com o IBGE em abril de 2016, o Brasil é o maior produtor comercial de bovinos do mundo, com cerca de 214 milhões de cabeças de gado. Este aumento tem como fator os ganhos de rendimento devido à utilização de genética avançada, o manejo de pastagem e a qualificação do pecuarista brasileiro, o que tende a crescer devido a modernização nesta área de produção (MAPA, 2016).

Dentro do setor de reprodução animal, destacam-se inovações biotecnológicas como a Inseminação Artificial (IA), a Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) (DOROTEU *et al.*, 2015), a Produção *In Vitro* de Embrião (PIVE) (VARAGO *et al.*, 2008), além da Transferência de Embriões (TE) (RUFINO *et al.*, 2006).

O Brasil ocupa o 20º lugar no ranking global de exportação de sêmen e de embriões bovinos, sendo o maior produtor desses embriões em laboratório, com cerca de 320 mil unidades anuais de embrião produzidos, o que representa metade do mercado mundial (CNA BRASIL, 2016). O que tende a aumentar ainda mais, principalmente na área da pecuária de corte na produção de matrizes de raças zebuínas, e um aumento não tão significativo, em gados de leite da raça *Bos taurus*, em comparação aos gados de corte (VARAGO *et al.*, 2008).

Essas biotécnicas têm sido utilizadas de modo alternativo para acelerar a produção de animais geneticamente superiores, proporcionando melhoramento animal na seleção de matrizes com alto potencial; diminuindo também o intervalo entre gerações; na produção de embriões para comercialização (VARAGO *et al.*, 2008).

Produção *in vitro* de embrião é uma biotécnica recente que visa à obtenção de embriões fora do aparelho reprodutivo das fêmeas onde envolve a etapa de colheita de oócitos dos folículos ovarianos, que seguem por três etapas biológicas: maturação *in vitro* de oócitos recuperados de folículos ovarianos (*in vivo* ou *in vitro*) (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e o cultivo *in vitro* (CIV), etapa onde ocorre o desenvolvimento do zigoto até os estágios de blastocistos (VARAGO *et al.*, 2008; MORAES, 2018).

Durante o cultivo de embriões em laboratório, as células estão expostas em altas concentrações de oxigênio, o que leva a maior produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), fazendo com que as células percam a função devido aos constantes danos (CHWA *et al.*, 2006), e sabendo disso, para se obter embriões de boa qualidade, se faz necessário a redução da produção de radicais livres aumentando a quantidade de antioxidantes disponíveis

nos meios de cultura através da suplementação, o que tem influência direta na PIVE, onde essas moléculas devido ao estresse oxidativo causam alterações negativas nas etapas de MIV, FIV e CIV. (TRINDADE *et al.*, 2016).

Sendo assim, para redução das EROs a pesquisa busca avaliar os efeitos dessas moléculas nas etapas da PIVE, e a relação com as estruturas celulares. Diante disso, este trabalho salienta outra possibilidade de produto a ser utilizado como meio de cultivo, a partir disso optou-se pela utilização da amora miúra como alternativa mais viável e acessível economicamente para a PIVE.

2. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Produção *in vitro* de Embrião

Assimilando o que ocorre *in vivo*, a PIVE compreende em três etapas produzidas em laboratório: a maturação oocitária, a fecundação dos oócitos e o cultivo embrionário até os estádios de mórula e blastocisto (VARAGO *et al.*, 2008). A técnica se aprimorou com o uso da ultrassonografia, o estudo morfofisiológico de embriões e gametas, meios alternativos de cultivo, entre outros (VARAGO *et al.*, 2008). Um trabalho desenvolvido no Acre, Rondônia e Bolívia, mostrou que a taxa de gestação em Nelore foi em média 45% em vacas receptoras de primeira ou segunda cria quando utilizados a técnica de Produção *in vitro* de Embrião, independente de propriedades, localização, ano, estações do ano e técnico que realizou TE (JAGUSZESKI, 2019).

Antes da PIVE temos a fase que inclui a colheita de oócitos dos folículos antrais juntamente com complexo *cúmulo-oócito* (CCO), técnica feita em laboratório (*in vitro*) através de ovários obtidos de matadouro, ou *in vivo* por meio de laparoscopia vaginal ou via flanco, ou pela técnica da aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom – *Ovum Pick Up* (OPU) (VARAGO *et al.*, 2008), sendo a última de eleição para a espécie bovina, por se apresentar mais tolerante que as outras técnicas. (GONÇALVES *et al.*, 2007; ANDRADE *et al.*, 2012).

Após a recuperação do CCO, as etapas seguintes que eram para ocorrer no interior da fêmea, são feitos no laboratório (VARAGO *et al.*, 2008), onde na maturação, o oócito passa por inúmeros eventos químicos e estruturais nucleares e citoplasmáticos, para que subsequente possa ser fecundado e se desenvolva até o estágio de blastocistos. (VARAGO *et al.*, 2008).

De acordo com Gordon (1994), as taxas de produção embrionária em bovinos quando os oócitos foram submetidos a 32 horas de maturação foram reduzidos, enquanto que outros trabalhos mostraram que a taxa de oócitos maturados por 18 horas foram semelhantes aos que se tornaram maduros em 24 horas. Tal fato, torna este tempo mais utilizado e de eleição para se evitar baixas taxas de produção embrionária (WEHREND & MEINECKE, 2001; GORDON, 1994).

Vários meios estão sendo estudados e testados como protocolos de maturação, como o *Synthetic Oviductal Fluid* (SOF) e o *Tissue Culture Medium 199* (TCM 199®), sendo o TCM199® mais utilizado nos laboratórios de PIV e na maioria suplementados com soro fetal bovino (SFB), aminoácidos como L-glutamina, bicarbonato de sódio, FSH, LH, piruvato de sódio, lactato, vitaminas e antibióticos (GANDHI *et al.*, 2000). E ainda se faz necessário, para obter bons resultados, o uso de uma estufa com atmosfera gasosa controlada contendo 5% de dióxido de carbono (CO₂) em ar e umidade saturada, num período de vinte e quatro horas, já descrito (GONÇALVES *et al.*, 2007; VARAGO *et al.*, 2008). Então, somente depois da conclusão desses eventos de maturação, é o que oócito está competente à fecundação (MINGOTI, 2005).

Antes de serem colocados juntos aos oócitos já maturados, os espermatozóides (sptz) precisam ser capacitados, ou seja, precisam estar aptos a fecundação adquirindo a capacidade de penetrá-los devido ao aumento da fluidez da membrana plasmática e o auxílio da reação acrossômica (VARAGO *et al.*, 2008).

Como na FIV bovina se utiliza em geral o sêmen congelado, eles precisam ser selecionados e escolhidos os capacitados após o descongelamento (VARAGO *et al.*, 2008), e para essa seleção utiliza-se entre outros, o gradiente de Percoll (MATURANA *et al.*, 2019), em duas ou três fases de diferentes concentrações (90, 45 e 30%) (GONSALVES *et al.*, 2002). Depois de selecionados, para se evitar polispermia e calculado de acordo com a população viva e a motilidade, a concentração utilizada é de 2×10^6 espermatozóides/ml (GONSALVES *et al.*, 2002).

O meio mais utilizado *in vitro* para fertilização é o *Tyrode-albuminalactato-piruvato* (TALP), onde foi originalmente descrito por Bavister e Yanagimachi em 1977, com pH de 7,8 e tempo de incubação de 6 a 24 horas de acordo com os protocolos estabelecidos, utilizando temperatura ideal de 39°C e com atmosfera de 5% de CO₂ em ar e umidade saturada (GONSALVES *et al.*, 2002; GARCIA *et al.*, 2005; MINGOTI, 2005). Podendo atingir 40% de oócitos fecundados na espécie bovina, comparado às outras espécies (BAVISTER, 2002).

Após a MIV e a FIV, estão formados os zigotos, onde passarão por sucessivas clivagens e divisões celulares, até formarem o blastocisto, estágio adequado para se fazer a TE ou criopreservação *in vitro* (GONSALVES *et al.*, 2002; MINGOTI, 2005; MELLO *et al.*, 2016)

Na década de 80 era utilizado o co-cultivo de embriões com células somáticas (GANDOLFI & MOOR, 1987), como células do oviduto e da granulosa, que dependendo da concentração dificultava a avaliação da relação dos componentes, por esse motivo foi substituído por outros meios de cultivo, como foi o caso do SOF (GONSALVES *et al.*, 2002; VARAGO *et al.*, 2008) onde obteve melhor resultado e o qual ainda é amplamente utilizado (SILVEIRA, 2019), desenvolvido por Tervit *et al.* (1972) e posteriormente modificado por Takahashi e First (1992).

De acordo com Mingoti (2005), os laboratórios utilizam pouco ou nenhum soro, com atmosfera de cultivo de baixa tensão de oxigênio (5%), CO₂ 5% e N₂ 90%, com umidade saturada a 39°C. Esses padrões fazem com que melhore as reações biológicas, o aspecto e qualidade do embrião (LIM *et al.*, 1999).

A etapa de CIV vai até o 7º dias após a fecundação *in vitro* (VARAGO *et al.*, 2008), podendo alcançar até o 8º ou 9º dia (GONSALVES *et al.*, 2002; MINGOTI, 2005). Os embriões que alcançam o estágio de blastocistos chegam apenas entre 25 a 40% (BAVISTER *et al.*, 1992; LONERGAN *et al.*, 2001), o que faz com que esta etapa da PIVE seja ainda mais estudada para obter melhores resultados (GALLI *et al.*, 2003)

A aplicação de biotécnicas de reprodução em animais de produção está gerando considerável impacto na produção de alimentos e no setor de agronegócio, devido aumento do potencial de inovações aplicadas no rebanho brasileiro, o que pode ser maximizado devido ao aprimoramento dessas técnicas, garantindo maior produção de alimentos e de baixo custo à população, assim como a preservação desses recursos genéticos para serem utilizados outrora. (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

Apesar do avanço na técnica e do uso da biotecnologia, a produção *in vitro* ainda apresenta baixa eficiência, seja na taxa de gestação, como na qualidade e formação dos embriões produzidos (PONTES *et al.*, 2009). Tais limitações podem estar ligadas à distância entre as fazendas onde os oócitos foram coletados e embriões transferidos, e os laboratórios onde são produzidos (GONÇALVES *et al.*, 2007), também relacionados às condições de estresse durante as etapas da PIVE, tendo como consequência a baixa da eficiência da produção devido entre outras coisas a alta concentração de oxigênio atmosférico fazendo com que eleve a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (LUCAS *et al.*, 2015).

Assim, desenvolvendo métodos e técnicas de criopreservação, incubação e meios de cultivo eficientes, permitem o melhor desenvolvimento e aprimoramento da biotécnica, como

é o caso da adição de suplementos químicos ao meio de cultivo, como citou o autor Lucas *et al* (2015). E, por meio desses estudos, podem-se diminuir o intervalo entre partos e utilizar vacas doadoras sem levar em consideração o estágio do ciclo estral, o que não irá interferir no número de oócitos para a PIVE. (VARAGO *et al.*, 2008).

3.2 Espécies Reativas de Oxigênio

As EROs também chamadas de radicais livres, são partículas químicas compostas por um ou mais átomo de oxigênio, podendo conter também um ou mais elétrons não pareados, o que faz com que a molécula se torne demasiadamente reativa (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2015), conferindo efeitos deletérios as estruturas celulares, como ácidos nucléicos, lipídios de membranas, e também em proteínas devido ao estresse oxidativo, interferindo na capacidade fertilizante (WHITE, 1993).

Esses radicais livres podem ser sintetizados através de reações catalisadas por metais; são produzidos durante a inflamação por macrófagos e neutrófilos, e também são subprodutos da cadeia respiratória mitocondrial (RUTTKAY-NEDECKY, 2013). A partir do mecanismo de fosforilação oxidativa, produtos da atividade mitocondrial, são produzidos os principais EROs no ambiente intracelular que são Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2), o radical superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila (OH^-) (WIESE *et al.*, 2017).

A formação do radical superóxido (O_2^-) é espontânea a partir da adição de um elétron ao oxigênio molecular, produto da cadeia respiratória pelo NADH que ocorre na membrana mitocondrial, não tendo o potencial considerável de penetração em membrana lipídica, diferente do radical hidroxila (OH^-) que é considerado mais reativo, onde é formado a partir do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) catalisado por íons metais como o Fe^{++} ou Cu^{++} (NORDBERG & ARNÉR, 2005). Por outro lado, o H_2O_2 , é seriamente prejudicial pela capacidade de penetrar membranas biológicas e ter mais tempo de vida (NORDBERG & ARNÉR, 2005).

Os efeitos deletérios das EROs sobre os espermatozoides devido a exposição em altas concentrações (MACLEOD, 1943), interfere na capacidade fertilizante, devido sensibilidade à lesões peroxidativas, o que induzem a produção de mais EROs deixando o sptz ainda menos inviável (WHITE, 1993; ALVAREZ & DE MORAES, 2006).

Algumas moléculas intracelulares são responsáveis em equilibrar a concentração de EROs no citoplasma para posteriormente não haver outros danos a estruturas celulares. (TAMURA *et al.*, 2012). Sendo assim, para aprimoramento da técnica de acordo com Lucas *et al* (2015) e Tamura *et al* (2012), adiciona-se suplementos químicos ao meio de cultura.

3.3 Agentes Antioxidantes

São agentes responsáveis pela inibição ou redução da oxidação do substrato, ou seja, das lesões causadas pelos radicais livres nas células (HALLIWEL & GUTTERIDGE, 1989; STEINER, 2002).

Elas podem ser compostas por elementos enzimáticos produzidos pelo organismo (STEINER, 2002) como as Superóxido Dismutase (SODs) (que necessita de selênio), as Catalases (CAT) e as Glutationas Peroxidases (GPX) (HALLIWELL, 1990; PISOSCHI & POP, 2015); e por agentes não enzimáticos onde precisam ser incorporados através da alimentação, como as vitaminas lipossolúveis (Vitamina A) (HALLIWELL, 1990; STEINER, 2002), vitaminas hidrossolúveis (Vitamina C) (NOMOTO *et al.*, 2006; GHYASVAND *et al.*, 2015; STEINER, 2002), além de oligoelementos (zinco, selênio e cobre) (HALLIWELL, 1990), entre outros.

E ainda assim, com o vasto número de antioxidantes utilizados na PIVE, na espécie bovina, ainda não está determinado qual é o mais conveniente para o desenvolvimento do embrião. (ROCHA-FRIGONI *et al.*, 2016; NIKSERESHT *et al.*, 2017; SOVERNIGO *et al.*, 2017). CAT, SOD e GPX são as principais moléculas responsáveis pelo balanceamento na concentração de EROs nas células, tornando as espécies químicas menos reativas, ou seja, menos prejudicial às células. (YATOO *et al.*, 2014)

Estudos mostraram que a influência desses suplementos na MIV mesmo que ainda não muito esclarecidos, aumentaram significativamente o número de blastocistos devido o envolvimento de fatores de crescimento levando a melhora da competência oocitária (CARNEIRO *et al.*, 2003), mesmo que nas adequadas condições nem todos os oócitos respondem a estas condições (SIRARD *et al.*, 1998), o que mostra que essas células se expressam melhor aos seus constituintes originais (SIRARD, 2001).

2.3.1 Selênio

O selênio é um mineral que tem o metabolismo complexo e único (BOPP *et al.*, 1982); tem função antioxidante, fazendo parte da composição da enzima Glutathione peroxidase (GSH-PX) essencial à proteção da membrana celular dos oócitos (SMITH & AKINBAMIJO, 2000) e para maturação dos folículos ovulatórios (NASCIMENTO, 2008), atuando na produção da Glutathione Reduzida (GSH) que vai contribuir para interiorizar metais, inclusive o ferro no embrião atuando também como fator de crescimento (LIM & HANSEL, 2000; AUGUSTIN *et al.*, 2003).

Aréchia *et al* (1994) dizem que radicais livres prejudicam vários mecanismos inclusive os reprodutivos, como o desenvolvimento embrionário. Portanto, *in vivo*, além de facilitar a passagem dos espermatozoides e entre outras funções, o selênio se apresenta como protetor do embrião durante toda a gestação, devido à diminuição da função de anticorpos e neutrófilos (NASCIMENTO, 2008). Foi relatado que 50 a 90% do selênio proveniente da dieta é absorvido e utilizados pelo organismo (BURK *et al.*, 1995).

Um ou mais átomos de selênio se liga a uma cadeia semelhante à cisteína no local de ligação do enxofre, formando a selenocisteína que é a principal molécula de função do selênio, e estas formam selenoproteínas. Essas reações fazem com que a enzima GPX se torne de 100 para 1000 vezes mais ativa, removendo moléculas tóxicas como é o caso do peróxido de hidrogênio, assim como anuncia à célula a existência dessas moléculas (BURK *et al*, 1995; 2002).

2.3.2 Vitamina C

A Vitamina C também conhecida como ácido ascórbico, é uma vitamina hidrossolúvel e que tem ação potencialmente antioxidante. Ela está presente nos ovários e também tem função de facilitar o crescimento folicular. (MURRAY *et al.*, 2001).

Ela atua na captação e liberação de íons hidrogênios, juntamente com a glutathione reduzindo a sínteses de radicais livres (ROCK *et al.*, 1996; NORDBERG & ARNÉR, 2001), principalmente como no caso da formação de hidroperóxido lipídico nas lipoproteínas de membrana e plasmáticas. (NORDBERG & ARNÉR, 2001).

Entretanto, na presença de metais pesados como o Fe ou o Cobre, ou até mesmo em doses elevadas de vitamina c, devido a ação pró-oxidante leva a ocorrência de peroxidação lipídica, assim como danos ao DNA e proteínas (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

2.3.3 Zinco

O zinco (Zn) é um micronutriente essencial que tem papel importante na composição de várias proteínas, peptídeos e enzimas incluindo a Superóxido Dismutase de cobre/zinco (CuZnSOD) (FALCHUK, 1998; PRASAD, 2003; CATHOMEN & JOUNG, 2008); no metabolismo de carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos (MAFRA & COZZOLINO, 2004; MEDEIROS, 2012; MCCALL *et al.*, 2000) protegendo componentes celulares e o DNA de danos oxidativos, retrocedendo-se na deficiência do mineral (TAYLOR *et al.*, 1988).

Ele compõe metaloproteínas presentes na organogênese e no desenvolvimento embrionário (FALCHUK, 1998; KAMBE *et al.*, 2008) e a nível laboratorial está ligado à albumina e associado às pontes de sulfidrila de proteínas de membrana (EIDE, 2006).

Através de uma reação redox, a glutatona é capaz de liberar o Zn da metalotioneína (CHEN & MARETE, 2001), que atua como ligante biológico na síntese de complexos binários e terciários com o zinco em baixas concentrações (KREZEL *et al.*, 2003; CORTESE *et al.*, 2008; MARET, 1994).

3.4 Amora Miúra (*Morus nigra*)

Conhecida popularmente como amora-miúra, amora, amoreira e amora preta, a espécie *Morus nigra* (IPNI, 2019) pertence ao gênero *Morus*, que possui cerca de 24 espécies e uma subespécie (ERCISLI & ORHAN, 2007).

Este gênero possui na sua composição: ácido ascórbico, aminoácidos, caroteno, sais minerais (SILVA, 2012) e compostos fenólicos, que reage com radicais livres, e estes são consumidos durante a reação (ANGELO & JORGE, 2007), como flavonoides, cumarinas, xantonas (NOMURA & HANO, 1994; WANG *et al.*, 2009), conferindo alto potencial

antioxidante (FUKAI *et al.*, 2003; NADERI *et al.*, 2004), além de efeito antiinflamatório, diurético, hipotensor e hipoglicemiante (PADILHA *et al.*, 2010; SYAH *et al.*, 2000).

Estudos mostram que extratos de *Morus nigra* apresentam ação protetora contra danos peroxidativos de biomembranas e biomoléculas (NADERI *et al.*, 2004). Foram também demonstrados por Oliveira e colaboradores (2013), a baixa toxicidade pré-clínica e os efeitos antioxidantes em ratos após a ingestão de extrato da amora miúra.

Um estudo feito com fragmentos de ovários de ovelhas contendo folículos pré-antrais, mostrou mais resistência nos grupos que utilizaram extratos de folhas de amora miúra no meio no que diz respeito a sua sobrevivência, quando comparados ao grupo controle do laboratório (CAVALCANTE *et al.*, 2017). Sendo este efeito também, descrito em testes feitos com cultura de células cancerígenas, conferindo efeito apoptótico e aumento da citotoxicidade nos grupos que utilizaram extrato da folha da fruta (E SILVA, 2016).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar uso do suplemento Amora Miúra em oócitos bovinos durante a maturação *in vitro* e suas consequências no desenvolvimento embrionário.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito antioxidante na taxa de clivagem no segundo dia de cultivo.
- Avaliar o efeito antioxidante na taxa de blastocistos no sétimo dia de cultivo.

4. METODOLOGIA

4.1 Delineamento Experimental

Foram avaliadas duas concentrações do suplemento de amora no meio de maturação *in vitro* de oócito da espécie bovina. Os oócitos foram distribuídos entre os grupos experimentais: Grupo G1 com 70 oócitos (Meio de maturação *in vitro* com a adição de 0,5 mg/ml de amora); Grupo G2 com 68 oócitos (Meio de MIV com adição de 0,25 mg/ml de amora); e Grupo Controle G3 com 65 oócitos (Meio de MIV com adição de β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich), melatonina (Sigma-Aldrich) e insulina-transferrina-selênio (ITS) (Gibco Life Technology – concentrado 100 vezes), num total de 5 experimentos durante o trabalho. Foram avaliadas as taxas de clivagem e formação de blastocistos nos dias 2 e 7, do desenvolvimento embrionário, respectivamente.

4.2 Obtenção dos Ovários

Os ovários foram obtidos em abatedouro frigorífico local. Os ovários foram coletados logo após o abate, lavados em PBS e acondicionados em frasco com solução salina (0,9% cloreto de sódio) à temperatura de 30 a 35°C e transportados até o Laboratório de Fecundação *in vitro* do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará dentro de um período máximo de duas horas para a realização da punção folicular.

4.3 Recuperação e Seleção dos Complexos Cúmulo-oócitos

De acordo com a metodologia do Laboratório de Fecundação *in vitro* da Universidade Federal do Pará em 2019 (Lab FIV - UFPA), os folículos antrais de 2 a 8 mm foram puncionados utilizando-se agulhas 40x12 e seringas de 10 mL, sendo o fluido folicular obtido depositado em tubos de 15 mL. Terminada a aspiração, os tubos foram centrifugados por 5 segundos de forma que houvesse a separação do sobrenadante e do *pellet* onde se encontram os CCOs (Complexos *Cumulus oophurus*). A porção líquida foi desprezada e o sedimento foi transferido para uma placa de Petri estéril de poliestireno de 60 mm de diâmetro. O

rastreamento dos CCOs foi realizado com auxílio de lupa estereomicroscópica. Os CCOs com citoplasma homogêneo, sem vacúolos ou grânulos escurecidos e que apresentavam células do compactas e refringentes foram lavados e selecionados em TALP Hepes acrescido 10% de SFB (v/v), e antibióticos.

4.4 Maturação *in Vitro* (MIV)

Os CCOs foram lavados e incubados, em meio de MIV de acordo com os grupos experimentais (0,5 mg/ml amora; 0,25 mg/ml amora e TCM 199 suplementado com bicarbonato de sódio, 10% SFB (v/v), FSH, LH, piruvato, antibióticos, EGF). A incubação foi feita em placas de Petri com gotas de 100 µL de meio (10 a 13 CCOs por gota) sob óleo mineral estéril, em estufa de cultivo com 5% de CO₂, 20% de O₂ e 75% de N₂ sob atmosfera úmida e temperatura de 38,5°C por um período de 24 horas.

4.5 Fecundação *in Vitro* (FIV)

Após a MIV, ainda de acordo com o Lab FIV, para a fecundação *in vitro* foi utilizado sêmen congelado de um único touro (*Bos indicus*). O método de separação dos espermatozoides dos crioprotetores e plasma seminal foi o gradiente de densidade descontínuo de Percoll. A mini-palheta (500mL) de sêmen foi descongelada em água a 35°C durante 30 segundos. Em seguida, o sêmen foi depositado sobre a coluna de 800mL de Percoll (gradientes de 45 e 90%) e centrifugado (600 giros) durante 7 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* lavado por centrifugação durante 3 minutos para remoção dos resíduos de Percoll, em 800 mL de meio TALP. Após as lavagens, a concentração espermática foi determinada, com auxílio de uma câmara de Neubauer, e ajustada para 2×10^6 spz/mL. Os espermatozoides foram colocados nas gotas (80 mL) de meio de fecundação (TALP, suplementado com heparina, penicilamina, hipotaurina, epinefrina e BSA), junto com os CCOs (10 a 13 por gota). Oócitos e espermatozoides permaneceram co-incubados nas mesmas condições citadas para a MIV por um período de aproximadamente 24 horas.

4.6 Cultivo *in Vitro* (CIV) dos embriões

Em seguida, no Cultivo *in vitro* de acordo com o Lab FIV, os prováveis zigotos foram submetidos a sucessivas pipetagens para retirada das células do cúmulus restantes e dos espermatozoides aderidos à zona pelúcida e então foram transferidos para gotas de cultivo, onde permaneceram por sete dias. O desenvolvimento embrionário foi realizado em um sistema de co-cultivo dos embriões com as células da granulosa que aderiram a placa durante a MIV. O meio de cultivo utilizado foi o *Sintetic Oviductal Fluid* (SOF) suplementado com 10% de SFB, 1mM de glicose, 10µg/mL de insulina, 6mg/mL de BSA, 80µg/mL piruvato e gentamicina.

4.7 Análises Quantitativa do Desenvolvimento Embrionário

A avaliação quantitativa do desenvolvimento embrionário foi realizada no segundo dia de cultivo, mediante a contagem das taxas de clivagem e no sétimo dia de cultivo, através da taxa de formação de blastocisto. Todas as análises foram feitas sob observação utilizando lupa estereomicroscópio, conforme Sociedade Internacional de Transferência de Embriões - IETS (STRINGFELLOW & SEIDEL 1998).

4.8 Análise Estatística

Ao final de todas as repetições os valores percentuais médios das taxas de desenvolvimento embrionário foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com o pós-teste de Tukey, adotando-se o nível de significância de 5%, com auxílio do programa SigmaPlot®.

5. RESULTADOS

As análises das taxas de produção de embrião demonstraram que não houve diferença significativa entre os grupos com diferentes concentrações do suplemento de extrato de amora miúra ($p>0,05$). Conforme demonstrado no quadro abaixo, onde são mostrados valores em média $\pm$ desvio padrão.

Tabela 1: taxa média de clivagem e taxa de embrião em concentrações diferentes de amora miúra

	Oócitos (n)	Taxa de clivagem (D2)	Taxa de embrião (D7)	Embrião/Clivagem
		%	%	%
G1	70	79,605 $\pm$ 8,532	27,522 $\pm$ 3,295	34,746 $\pm$ 4,737
G2	68	70,757 $\pm$ 18,217	22,922 $\pm$ 12,784	34,509 $\pm$ 21,250
G3	65	77,996 $\pm$ 6,841	33,541 $\pm$ 12,947	41,707 $\pm$ 13,293

No segundo dia após a FIV, em que foi analisado a taxa de clivagem, os resultados não demonstraram diferença significativa entre os grupos experimentais com as diferentes concentrações de extrato de amora miúra na produção *in vitro* de embrião ($p>0,05$).

Referindo-se agora a taxa de produção de blastocisto no sétimo dia de cultivo também não houve diferença significativa entre os tratamentos de diferentes concentrações de amora miúra em relação ao grupo controle (G3) ($p>0,05$).

6. DISCUSSÃO

Como observado nos resultados, não houve diferença significativa em relação ao grupo controle com antioxidantes já utilizados na produção *in vitro* de embrião. Contudo, a utilização do suplemento amora miúra demonstrou ser uma fonte alternativa de moléculas antioxidantes na produção *in vitro*, por ser um suplemento alimentar comercialmente acessível, de custo não elevado e facilmente encontrado em farmácias populares, sendo assim, um pote com 30 cápsulas de 500mg que possui um valor médio 30 reais, é estimado que a utilização deste reduz cerca de 3000% os custos comparados ao meio padrão do Lab. FIV.

Pelo fato de não podermos afirmar qual a composição exata do suplemento mesmo com pesquisas feitas com o extrato do fruto, nem a sua procedência ou grau de pureza de cada componente, ainda assim, foi utilizado de modo alternativo na Produção *in vitro* de embrião, para se ter conhecimento sobre os seus efeitos. E como citado na literatura, os componentes principais da amora miúra, separadamente, interagem com as células e tem influência sobre a PIVE (SIRARD, 2001). E como os resultados não mostram que foram inferiores, sugere então bloqueios de radicais livres e assim a diminuição de estresses oxidativos.

Um dos fatores que pode ter influenciado em tal resultado é a concentração de amora utilizada no trabalho, que pode não ter sido suficiente a ponto de proporcionar um aumento na produção de enzimas antioxidantes e assim ter influência na quantidade de embriões produzidos.

A presença de moléculas antioxidantes como zinco, selênio e o ácido ascórbico presentes na amora miúra estão relacionadas à eficiência dos processos de maturação *in vitro* de oócitos bovinos (CARNEIRO *et al.*, 2003), apesar do fato de alguns dos CCOs não responderem adequadamente devido a variação da competência oocitária (SIRARD *et al.*, 1998). Apesar de os CCOs terem apresentado sinais de maturação oocitária (expansão das células da granulosa), não foi avaliado neste trabalho a influência do complexo antioxidante de amora no processo de capacitação do oócito, assim como a taxa de maturação. Logo, outras análises, como a expressão dos genes das enzimas antioxidantes e avaliação de marcadores de maturação podem ser utilizadas para melhor avaliar o papel do suplemento de amora durante a maturação *in vitro*.

Logo, para avaliar melhor o efeito do antioxidante no embrião, sugere-se colocar o suplemento também no Cultivo *in vitro* dos embriões, onde diversos trabalhos na literatura relatam a utilização das moléculas antioxidantes presentes na amora miúra separadamente, onde cada um agiria em uma cascata de ação enzimática para controle do balanço oxidativo celular (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; PRASAD, 2003). Neste trabalho tais moléculas foram utilizadas de forma conjunta, entretanto não podemos afirmar que o uso sinérgico delas pode ter influenciado nas taxas de produção ou levado a uma pró-oxidação parcial.

Em laboratório, a adição de ácido ascórbico em meio de cultura resultou no aumento da competência do desenvolvimento do embrião (TATEMOTO *et al.*, 2001), também demonstraram em ratos e camundongo prevenir apoptose folicular, e em camundongos a melhora na produção de blastocistos (EPPIG *et al.*, 2000; TILLY *et al.*, 1995), além de prevenir a apoptose de células da granulosa (MURRAY *et al.*, 2001).

Apesar de ainda não muito claro sobre o papel do zinco como antioxidante, estudos relatam que danos ao DNA de células do cumulus diminuíram significativamente na presença do zinco na MIV (PICCO *et al.*, 2010), e que suplementação do meio com Zn antes do estresse oxidativo leva a proteção desses danos ao DNA e à morte celular. (KOH *et al.*, 1996; EMONET-PICCARDI *et al.*, 1998; CHIMIENTI *et al.*, 2001). Em contrapartida, foi relatado que na deficiência de zinco houve um aumento de proteínas oxidativas e danos ao DNA em ratos e macacos (TAYLOR *et al.*, 1988; OLIN *et al.*, 1999).

Os antioxidantes presentes no grupo da amora miúra participam das mesmas vias dos antioxidantes presentes no grupo controle positivo, o que pode explicar os resultados parecidos. O selênio, que é dos componentes do suplemento, faz parte da composição da enzima Glutathione Peroxidase, e que é um excelente protetor de membrana, além de auxiliar na maturação do folículo ovariano e, *in vivo* funciona como protetor de embrião (SMITH & AKINBAMIJO, 2000).

Diversos trabalhos na literatura relataram que o selênio, quando usado na dieta de vacas doadoras em programas de PIVE, acarreta em maior quantidade oócitos viáveis e em total aspirado, além de maior qualidade de embriões e blastocistos expandidos. (MATAVELI *et al.*, 2012). A ausência de selênio acarreta na não formação de selenoproteínas, que iriam formar as GPX (BURK *et al.*, 1995). O beta-mercaptoetanol, presente no grupo controle positivo, também participa da composição da glutathione peroxidase, que é um composto

presente em atividades celulares além da proteção contra estresses oxidativos. (MEISTER & ANDERSON, 1983; LUBERDA, 2005; RAUSSEL & TARIN, 2005).

Durante a maturação de oócitos, uma quantidade de glutathione reduzida foi importante para a proteção do embrião até o estágio de blastocisto e para a expansão das células do cumulus (HO, 2004; FURNUS *et al.*, 1998), levando a melhora no desenvolvimento e na qualidade desses embriões (DE MATOS *et al.*, 1996; FURNUS *et al.*, 2008), especialmente em concentrações adequadas (PICCO *et al.*, 2010).

Então, outras análises podem ser feitas tanto com a amora miúra, ou com meios utilizando os antioxidantes simultaneamente, para se ter mais conhecimentos das suas interações com as células.

7. CONCLUSÃO

A adição do suplemento de amora miúra não demonstrou ser efetiva em melhorar as taxas de clivagem e de blastocistos. Entretanto, o suplemento demonstrou ser um substituto viável a utilização dos antioxidantes padrões utilizados na rotina de PIVE, tendo em vista que os resultados não demonstraram diferenças significativas em comparação ao grupo controle. Portanto, outras análises para se avaliar a qualidade dos embriões produzidos e a utilização de concentrações diferentes do extrato de amora devem ser realizadas para tentar entender melhor qual papel da utilização desse suplemento antioxidante na PIVE.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, C. A.; DE MORAES, G. V. Efeitos da selenometionina e vitamina c sobre o sêmen. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 1, n. 1, 2006. ISSN 1980-0002.
- ANDRADE G. A., FERNANDES M. A., KNYCHALA R. M., PEREIRA JÚNIOR M. V., OLIVEIRA A. J., NUNES D. P., BONATO G. L., SANTOS R. M. Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Ver Bras Reprod Anim**, v.36, p.66-69, 2012.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, p. 232-240, 2007.
- ARÉCHIA, C. F. *et al.* Effect of prepartum of vitamin E and selenium on postpartum reproductive function of dairy cattle. **Theriogenology**, UK, v.41, p.1251-1258. 1994.
- AUGUSTIN, R. *et al.* Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos produced *in vitro*. **Reproduction**, v. 126, n. 1, p. 91-99, 2003. ISSN 1470-1626.
- BAVISTER B. D. Early history of *in vitro* fertilization. **Reproduction**, v.124, p.181-196, 2002.
- BAVISTER B. D., ROSE-HELLEKANT T. A., PINYOPUMMINTR T. Development of *in vitro* mature/*in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. **Theriogenology**, v.37, p.127-146, 1992.
- BAVISTER B. D., YANAGIMACHI R. The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reactions of hamster spermatozoa *in vitro*. **Biol Reprod**, v.16, p.228-237, 1977.
- BOPP B. A., SONNERS R. C., KESTERSON J. W. Metabolic fate of selected selenium compounds in laboratory animals and man. **Drug Metab Rev.** 1982;13:271–318.
- BURK R. F. MD Division of Gastroenterology, Department of Medicine and Clinical Nutrition Research Unit, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, Tennessee. **Nutr Clin Care**, Mar/Apr 2002–Vol 5, No. 2.

BURK R. F., HILL K. E., AWAD J. A., *et al.* Pathogenesis of diquat-induced liver necrosis in selenium-deficient rats. **Assessment of the roles of lipid peroxidation and selenoprotein P. Hepatol.** 1995;21:561–569.

CARNEIRO G. F., NAKAZAWA M., CASTRO S. B. M., GOMES Y. M. Efeito do IGF-I na maturação *n vitro* de oócitos caprinos. *In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES*, 17, 2003, Beberibe, CE. **Anais.** Beberibe, CE: SBTE, 2003. p.286.

CATHOMEN T., JOUNG J. K. Zinc-finger nucleases: the next generation emerges. **Mol Ther** 2008;16:1200–7.

CAVALCANTE A. Y. P.; BARBERINO R. S.; GOUVEIA B. B.; BEZERRA M. É. S.; MENEZES V. G.; SOUZA G. R.; ROLIM L. A.; NETO P. J. R.; ALMEIDA J. R. G. S.; DE MATOS M. H. T. Efeito da conservação de tecido ovariano em extrato de *Morus nigra* sobre a morfologia e fragmentação de DNA de folículos pré-antrais ovinos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 38, n. 4, p. 1973-1986, jul./ago. 2017.

CHEN Y., MARET W. Catalytic selenols couple the redox cycles of metallothionein and glutathione. **Eur J Biochem** 2001;268: 3346–53.

CHIMIENTI F., JOURDAN E., FAVIER A., SEVE M. Zinc resistance impairs sensitivity to oxidative stress in Hela cells: Protection through metallothioneins expression. **Free Radic Biol Med** 2001;31:1179–90.

CHWA M., ATILANO S. R., REDDY V., JORDAN N., KIM D. W., KENNEY M. C. Increased stress-induced generation of reactive oxygen species and apoptosis in human keratoconus fibroblasts. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 2006; 47:1902–10.

CNA Brasil - Confederação da Agricultura e Pecuária. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/noticias/brasil-esta-apto-a-exportar-embrioes-bovinos-in-vitro-para-o-paraguai>. Acesso em: 05/09/2019.

CORTESE M. M., SUSCHEK C. V., WETZEL W., KRÖNCKE K. D., KOLB-BACHOFEN V. Zinc protects endothelial cells from hydrogen peroxide via Nrf2-dependent stimulation of glutathione biosynthesis. **Free Radic Biol Med** 2008;44:2002–12.

DE MATOS D. G., FURNUS C. C., MOSES D. F., MARTINEZ A. G., MATKOVIC M. Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. **Mol Reprod Dev** 1996;45:451–7.

DOROTEU, E. M.; OLIVEIRA, R. A.; PIVATO, I. Avaliação de diferentes doses de eCG na resincronização da ovulação em vacas nelore lactantes submetidas à IATF. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.16, n.2, p.449-457 abr./jun. 2015.

E SILVA, S. C. **Resposta das células de osteossarcoma humano saos - 2 ao extrato da folha de *Morus nigra***. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia), Faculdade da Ceilândia. Universidade de Brasília, 2016.

EIDE D. J. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. **Biochim Biophys Acta** 2006;1763:711–22.

EMONET-PICCARDI N., RICHARD M. J., RAVANAT J. L., SIGNORINI N., CADET J., BEANI J. C. Protective effects of antioxidants against UVA-induced DNA damage in human skin fibroblasts in culture. **Free Radic Res** 1998;29:307–13.

EPPIG J. J., HOSOE M., O'BRIEN M. J., PENDOLA F. M., REQUENA A., WATANABE S. Conditions that affect acquisition of developmental competence by mouse oocytes in vitro: FSH, insulin, glucose and ascorbic acid. **Mol Cell Endocrinol** 2000;163:109 –16.

ERCISLI, S.; ORHAN, E. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. **Food Chemistry**, v.103, p.1380-1384, 2007.

FALCHUK K. H. The molecular basis for the role of zinc in developmental biology. **Mol Cell Biochem** 1998;188:41– 8.

FERREIRA A. L. A.; MATSUBARA L. S.; Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.** vol.43 n.1 São Paulo Jan./Mar. 1997.

FIGUEIREDO J. R., GONÇALVES P. B. D., FREITAS V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2ª ed. Roca, São Paulo, p.408, 2008.

FUKAI, T.; SATOH, K.; NOMURA, T.; SAKAGAMI, H. Antinephritis and radical scavenging activities of prenylflavonoids. **Fitoterapia**, v.74, p.720-724, 2003.

FURNUS C. C., DE MATOS D. G., MOSES D. F. Cumulus expansion during *in vitro* maturation of bovine oocytes: relationship with intracellular glutathione level and its role on subsequent embryo development. **Mol Reprod Dev** 1998;51:76–83.

FURNUS C. C., DE MATOS D. G., PICCO S., GARCÍA P. P., INDA A. M., MATTIOLI G., ERRECALDE A. L. Metabolic requirements associated with GSH synthesis during *in vitro* maturation of cattle oocytes. **Anim Reprod Sci** 2008;109:88 –99.

GALLI C., DUCHI R., CROTTI G., TURINI P., PONDERATO N., COLLEONI S., LAGUTINA I., LAZZARI G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v.59, p.599-616, 2003.

GANDHI A. P., LANE M., GARDNER D. K., KRISHER R. L. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. **Human Reprod**, v.15, p.395-401, 2000.

GANDOLFI F., MOOR R. M. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. **J Reprod Fertil**, v.81, p.23-28, 1987.

GARCIA J. M., AVELINO K. B., VANTINI R. Estado da arte da fertilização *in vitro* em bovinos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1, 2005, Londrina, PR. **Biotecnologia da reprodução em bovinos**. Londrina, PR: UEL, 2005, 201p.

GHYASVAND T.; GOODARZI M. T.; AMIRI I.; KARIMI J.; GHORBANI M. Serum levels of lycopene, beta-carotene, and retinol and their correlation with sperm DNA damage in normospermic and infertile men. **International Journal of Reproduction Biomed**. v. 12, n. 13, p. 787-792. 2015.

GONÇALVES P. B. D., BARRETA M. B., SANDRI L. R., FERREIRA R., ANTONIAZZI A. Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.31, n.2, p.212-217, abr./jun. 2007. Disponível em: www.cbra.org.br

GONSALVES P. B. D., VISINTIN J. A., OLIVEIRA M. A. L. Produção *in vitro* de embriões. In: GONSALVES P. B. D., FIGUEIREDO J. R., FREITAS V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo, SP: Varela, 2002. p.195-226.

HALLIWELL B & GUTTERIDGE J. M. C. Free radicals in Biology and medicine: The chemistry of oxygen radicals and other derived species. 2ª edição. **Claredon Press**, OXFORD, 1989. p. 22-85.

HALLIWELL, B. How to characterize a biological antioxidant. **Free Rad. Res. Commun.**, v.9, p.1-32, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Free radicals in biology and medicine. **Oxford University Press**, USA, 2015. ISBN 0198717482.

HO E. Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk. **J Nutr Bioch** 2004;15:572– 8.

INTERNATIONAL PLANT NAMES INDEX. Disponível em: http://www.ipni.org/ipni/simplePlantNameSearch.do;jsessionid=836DA2424EB34D2B3B029EE94CDCC085?find_wholeName=morus+nigra&output_format=normal&query_type=by_query&back_page=query_ipni.html. Acesso em 20/10/2019.

JAGUSZESKI M. Z.; NETO A. P.; DE OLIVEIRA W.; CATTELAM J.; GREGIANINI H. A. G.; Pregnancy rate of recipient cows after transfer of *in vitro* produced nellore embryos. **Rev. Caatinga**, Mossoró, v. 32, n. 4, p. 1087 - 1091, out. - dez., 2019.

KAMBE T., WEAVER B. P., ANDREWS G. K. The genetics of essential metal homeostasis during development. **Genesis** 2008; 46:214 –28.

KOH J. Y., SUH S. W., GWAG B. J., HE Y. Y., HSU C. Y., CHOI D. W. The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia. **Science** 1996;272:1013– 6.

KREZEL A., WOJCIK J., MACIEJCZYK M., BAL W. May GSH and L-His contribute to intracellular binding of zinc? Thermodynamic and solution structural study of a ternary complex. **Chem Commun** 2003;6:704 –5.

LIM J. M., REGGIO B. C., GODKE R. A., HANSEL W. Development of *in vitro* derived bovine embryos cultured in 5% CO₂ in air or in 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂. **Hum Reprod**, v.14, p.458-464, 1999.

LIM, J.; HANSEL, W. Exogeneous substances affecting development of *in vitro*-derived bovine embryos before and after embryonic genome activation. **Theriogenology**, v. 53, n. 5, p. 1081-1091, 2000. ISSN 0093-691X.

LONERGAN P., RIZOS D., WARD F., BOLAND M. P. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. **Reprod Nutr Dev**, v.41, p.427-437, 2001.

LUBERDA, Z. The role of glutathione in mammalian gametes. **Reproductive Biology**, v.5, n.1, 5-17, 2005.

LUCAS, C. G.; REMIÃO, M. H.; KOMNINOU, E. R.; DOMINGUES, W. B.; HAAS, C.; LEON, P. M. M.; CAMPOS, V. F.; OURIQUE, A.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; BASSO, A. C.; SEIXAS, F. K.; BECK, R. C. R.; COLLARES, T. Tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules decrease reactive oxygen species levels and improve bovine embryonic development during *in vitro* oocyte maturation. **Reproductive Toxicology**, v. 58, p. 131-139. 2015.

MACLEOD, J. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. **American Journal of Physiology--Legacy Content**, v. 138, n. 3, p. 512-518, 1943. ISSN 0002-9513.

MAFRA, D.; COZZOLINO, S. M. F. Importância do zinco na nutrição humana. **Revista de Nutrição de Campinas** 2004, 17, 79.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Estatística. Agricultura Brasileira em Números – Anuário 2006. **Rebanho Bovino Brasileiro**. Disponível em: www.agricultura.gov.br. (Acesso em 05/09/2019).

MARET W. Oxidative metal release from metallothionein via zinc-thiol/disulfide interchange (metalloproteins/glutathione/ metal clusters/radiochromatography). **Proc Natl Acad Sci USA** 1994;91:237– 41.

MATAVELI, M.; *et al.* Oocyte aspiration and in vitro embryo production in Jersey cows with selenium-supplemented diet. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v. 64, n. 3, p. 787-795, 2012. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352012000400001.

MATURANA D.; GÓMEZ J. O.; RESTREPO G. B. Efecto de la quercetina sobre la tasa de desarrollo y la viabilidad de embriones bovinos producidos *in vitro*. **Rev. investig. vet. Perú** vol.30 no.2 Lima abr./jun. 2019.

MCCALL, K. A.; HUANG, C.; FIERKE, C. A. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. **The Journal of Nutrition** 2000, 130, 14375.

MEDEIROS, A. M. Elemento químico: Zinco. **Química Nova na Escola** 2012, 34, 159.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, v.52, n.1, 711-760, 1983.

MELLO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; SOUSA, S. L. G.; MELLO, M. R. B.; PALHANO, H. B. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.40, n.2, p.58-64, abr./jun. 2016. Disponível em: www.cbpa.org.br

MINGOTI, G. Z. Aspectos técnicos da produção *in vitro* de embriões bovinos. In: TÓPICOS AVANÇADOS EM BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO, 2005, Jaboticabal, SP. Jaboticabal, SP: Funep, 2005.

MORAES, M. E. B. **Produção *in vitro* de embriões bovinos suplementada com antioxidantes: efeitos no desenvolvimento embrionário e na taxa de prenhez**. Tese (Mestrado em Saúde e Produção de Ruminantes) Arapongas: UNOPAR, 2018. 68p.

MURRAY, A. A., MOLINEK, M. D., BAKER, S. J., KOJIMA, F. N., SMITH, M. F., HILLIER, S. G., SPEARS, N. Role of ascorbic acid in promoting follicle integrity and survival in intact mouse ovarian follicles *in vitro*. **Reproduction** 2001;121:89–96.

NADERI, G. A.; ASGARY, S.; SARRAF-ZADEGAN, N.; OROOJY, H.; AFSHIN-NYA, F. Antioxidant activity of three extracts of *Morus nigra*. **Phytotherapy Research**, v.18, p.365-369, 2004.

NASCIMENTO, E. E. **Suplementação de selênio na dieta de caprinos sobre a produção e qualidade do embrião**. Dissertação de Mestrado em Zootecnia– Área de Concentração Produção Animal. Universidade Estadual de Maringá, Paraná. 37p. 2008.

NIKSERESHT M. *et al.* Effect of Antioxidants (beta-mercaptoethanol and Cysteamine) on Assisted Reproductive Technology *in vitro*. **J Clin Diagn Res**, v. 11, n. 2, p. BC10-BC14,

Feb 2017. ISSN 2249-782X (Print) 0973-709X (Linking). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28384851>.

NOMOTO, S. *et al.* Influence of ascorbic acid on bonding of peroxide-affected dentin and 4-META/MMA-TBB resin. **Clinical Oral Investigations**, v.10, n.4, p. 325–330, dez. 2006.

NOMURA, T.; HANO, Y. Isoprenoid-substituted phenolic compounds of moraceous plants. **Natural Products Reports**, v.11, p.205-218, 1994.

NORDBERG, J. AND ARNER, E. S. J. (2001). Reactive Oxygen Species, Antioxidants and the Mammalian Thioredoxin System. **Free Radical Biology and Medicine**, 31, 1287-1312.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. Reactive Oxygen Species, Antioxidants, and the Mammalian Thioredoxin System. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 39, n. 10, p. 1287, 2005. ISSN 0891-5849.

OLIN K. L., SHIGENAGA M. K., AMES B. N., GOLUB M. S., GERSHWIN M. E., HENDRICKX A. G. Maternal dietary zinc influences DNA strand break and 8-hydroxy-2V-deoxyguanosine levels in infant rhesus monkey liver. **Proc Soc Exp Biol Med** 1999;203:461–6.

OLIVEIRA, A. C. B.; OLIVEIRA, A. P.; GUIMARÃES, A. L.; OLIVEIRA, R. A.; SILVA, F. S.; REIS, S. A. G. B.; RIBEIRO, L. A. A.; ALMEIDA, J. R. G. S.; Avaliação toxicológica pré-clínica do chá das folhas de *Morus nigra* L. (Moraceae). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.15, n.2, p.244-249, 2013.

PADILHA, M. M.; MOREIRA, L. Q.; MORAIS, F. F.; ARAÚJO, T. H.; ALVES-DA-SILVA, G. Estudo farmacobotânico das folhas de amoreira-preta, *Morus nigra* L., Moraceae. **Revista Brasileira de farmacognosia**, v. 20, n.4, p. 221-226, 2010.

PICCO, S. J.; ANCHORDOQUY, J. M.; DE MATOS, D. G. ANCHORDOQUY, J. P.; SEOANE, A.; MATTIOLI, G. A. ERRECALDE, A. L. FURNUS C. C.; Effect of increasing zinc sulphate concentration during *in vitro* maturation of bovine oocytes; **Theriogenology** 74 (2010) 1141–1148.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55-74. 2015.

PONTES, J. H.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B. V.; ERENO-JUNIOR, J. C.; UVO S.; BARREIROS T. R. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v. 71, p. 690–7. 2009.

PRASAD A. S. **Zinc deficiency**. *BMJ* 2003;326:409 –10.

RAUSSEL, F.; TARIN, J. J. Función del glutatión educido durante la maduración y fecundación de ovocitos desarrollo pre-implantatorio de embriones *in vitro* en mamíferos. **Revista Iberoamericana de Fertilidad**, v.22, n.6, 414-429, 2005.

ROCHA-FRIGONI, N. A. *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, n. 8, p. 1897-905, Nov 2016.

ROCK C. L., JACOB R. A., BOWEN P. E. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. **J Am Diet Assoc**. 1996;96(7):693-704.

RUFINO, F. A.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A. **Impacto do herpesvírus bovino 1 e do vírus da diarréia viral bovina na transferência de embriões**; *Archives of Veterinary Science*, v. 11, n. 1, p. 78-84, 2006).

RUTTKAY-NEDECKY, B.; NEJDL, L.; GUMULEC, J.; ZITKA, O.; MASARIK, M.; ECKSCHLAGER, T.; STIBOROVA, M.; ADAM, V.; KIZEK, R. The role of metallothionein in oxidative stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 3, p. 6044-6066. 2013.

SILVA, R. A. H. **Estudo da ação do extrato bruto de *Morus nigra* L. (Moreaceae) e frações fenólicas sobre a atividade antimicrobiana e geração de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio: *in vitro* com ensaios “químicos”, enzimáticos e celular**. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unesp. Araraquara, 2012.

SILVEIRA M. M. **Viabilidade de embriões bovinos produzidos in vitro transportados por diferentes tempos em meio de manutenção com antioxidantes.** Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, 2019 60p.

SIRARD M. A. Resumption of meiosis: Mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v.55, p.1241-1254, 2001.

SIRARD M. A., RICHARD F., MAYES M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**, v.49, p.483-497, 1998.

SMITH, O. B.; AKINBAMIJO, O. O. Micromutrients and reproduction in farm animals. **Animal Reproduction Science**, Egypt, v.60-61, p.549-560, 2000 Statistical Analyses System-SAS. SAS/STAT User's guide. Version 6, 4 ed.,v.2, Cary SAS Institute.

SOVERNIGO, T. C. *et al.* Effects of supplementation of medium with different antioxidants during *in vitro* maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. **Reprod Domest Anim**, v. 52, n. 4, p. 561-569, Aug 2017.

STEINER, D. Vitaminas antioxidantes e a pele. **Cosmetics e toiles**, edição em português, v. 14, n. 4, jul./ago., 2002.

STRINGFELLOW D. A. & SEIDEL S. M. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões.** Illinois: IETS. p. 112-113. 1998.

SYAH, Y. M.; ACHMAD, S. A.; GHISALBERTI, E. L.; HAKIM, E. H.; IMAN, M. Z. N.; MAKMUR, L.; MUJAHIDDIN, D. Andalsin A, a new stilbene dimmer from *Morus macroura*. **Fitoterapia**, v.71, p.630-635, 2000.

TAKAHASHI Y., FIRST L. N. *In vitro* development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. **Theriogenology**, v.37, p.963-978, 1992.

TAMURA, H.; TAKASAKI, A.; TAKETANI, T.; TANABE, M.; KIZUKA, F.; LEE, L.; TAMURA, I.; MAEKAWA, R.; AASADA, H.; YAMAGATA, Y.; SUGINO, N. The role of melatonin as an antioxidant in the follicle. **J Ovarian Res**, v.5, p.1757-2215, 2012.

TATEMOTO H., OOTAKI K., SHIGETA K., MUTO N. Enhancement of developmental competence after in vitro fertilization of porcine oocytes by treatment with ascorbic acid 2-O-alpha-glucoside during in vitro maturation. **Biol Reprod** 2001;65:1800–6.

TAYLOR C. G, BETTGER W. J., BRAY T. M. Effect of dietary zinc or copper deficiency on the primary free radical defense system in rats. **J Nutr** 1988;118:613–21.

TERVIT H. R., WHITTINGHAM D. G., ROWSON L. E. Successful culture in vitro sheep and cattle ova. **J Reprod Fertil**, v.30, p.493-497, 1972.

TILLY J. L., TILLY K. I. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. **Endocrinology** 1995;136:242–52.

TRINDADE, M. C., MACENTE, B. I., VICENTE, R. R. W., & APPARÍCIO, M. Estresse oxidativo na produção in vitro de embriões bovinos: Revisão de Literatura. **Revista Investigação Mecina Veterinária**, 15 (1), 37-45, 2016.

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

WANG, L.; GONG, T.; CHEN, R.Y. Two new prenylflavonoids from *Morus nigra* L. **Chinese Chemical Letters**, v.20, p.1469-1471, 2009.

WEHREND A., MEINECKE B. Kinetics of meiotic progression, M-phase promoting factor (MPF) and mitogenactivated protein kinase (MAP kinase) activities during *in vitro* maturation of porcine and bovine oocytes: species specific differences in the length of the meiotic stages. **Anim Reprod Sci**, v.66, p.175-184, 2001.

WHITE, I. G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. **Reprod Fertil Dev**, v. 5, n. 6, p. 639-58, 1993.

WIESE, A. K.; PRIOR, S.; CHAMBERS, T. C. Intracellular Oxygen Concentration Determined By Mitochondrial Respiration Regulates Production of Reactive Oxygen Species. **Integrative Cancer Biology & Research**, v. 1, n. 1. 2017.

YATOO, M. I.; DIMRI, U.; SHARMA, M. C. Seasonal changes in certain blood antioxidants in cattle and buffaloes. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 84, n. 2, p. 173-176. 2014.