



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – CEUB

PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

HALLYA BEATRIZ SOUSA AMARAL

JOÃO VITOR LIMA BARBOSA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE INSULINA TRANSFERRINA SELÊNIO (ITS) NA
MATURAÇÃO IN VITRO DE OVÓCITOS BOVINOS**

BRASÍLIA

2021



HALLYA BEATRIZ SOUSA AMARAL

JOÃO VITOR LIMA BARBOSA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE INSULINA TRANSFERRINA SELÊNIO (ITS) NA
MATURAÇÃO IN VITRO DE OVÓCITOS BOVINOS**

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e Pesquisa.

Orientação: Prof. Dr. Andrei Antonioni Guedes Fidelis

Coorientação: Dra. Margot Alves Nunes Dode

BRASÍLIA

2021

AGRADECIMENTOS

Aos nossos pais por terem nos dado a oportunidade de estudar e pela compreensão em todos os momentos que não pudemos estar presentes por estarmos correndo atrás dos nossos estudos e carreira.

Ao Andrei, nosso mentor, inspiração, orientador, chefe, amigo e pai de profissão. Por todo conhecimento que nos proporcionou, pelas oportunidades, pela paciência em nos ensinar, por acreditar em nós e continuar persistindo na nossa formação como profissionais qualificados.

À Ligi, por todo ensinamento dentro da Embrapa que possibilitou a realização desse projeto, por toda ajuda durante esses meses, pela paciência em ensinar e compreensão.

Ao Otávio e Letícia por sempre estarem dispostos a auxiliar de alguma forma e por toda ajuda no desenvolvimento do projeto.

Aos nossos orientadores da Embrapa, Dra. Margot e Dr. João Henrique, que graças a eles também tivemos essa oportunidade maravilhosa e muito enriquecedora.

E um ao outro, pelo apoio, ajuda e companheirismo nesses meses.

RESUMO

A produção de embriões *in vitro* se mostra como uma boa ferramenta de melhoramento genético e multiplicação de animais superiores, visando aumentar a produtividade do plantel. Espécies reativas de oxigênio são um problema comum na produção de *embriões in vitro* (PIVE), uma vez que produzidos em excesso, podem causar problemas no material genético e lipoperoxidação. Portanto, torna-se necessário buscar uma regulação de sua produção de forma segura buscar compostos mais eficientes, estáveis, seguros e não tóxicos para a suplementação dos meios utilizados para produção de embriões. Os ovócitos coletados de ovários oriundos de abatedouro foram submetidos a quatro tratamentos tendo o complexo cumulus oophorus (COC) mensurado pré e pós o processo de maturação *in vitro* (MIV), verificando se houve uma melhora na área de expansão. Posteriormente foram fixados, corados com solução Lacmoide e avaliados quanto a sua cinética de maturação. Dentre os quatro tratamentos, o uso de tratamentos com ITS mostrou uma média estatisticamente menor do que os demais grupos sem o uso desse complexo ($p < 0,05$). Já relativo à cinética de maturação, nenhum dos tratamentos demonstrou aumento significativo na quantidade de ovócitos em metáfase II ($p > 0,05$), estágio de completa maturação nuclear e competência ovocitária. Portanto há uma necessidade de mais estudos para avaliar outras formas de suplementação com ITS e associações onde tal complexo pode ser funcional, bem como na produção e qualidade de embriões.

Palavras-chave: Antioxidante, produção *in vitro*, radical livre.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	8
2.1. Maturação <i>in vitro</i> de ovócitos	8
2.2. Fatores que influenciam na maturação <i>in vitro</i> de ovócitos.....	9
2.2.1. Estresse oxidativo e produção de espécies reativas de oxigênio.....	9
2.3. Uso de antioxidantes na maturação <i>in vitro</i>	10
2.4. Uso de ITS na maturação <i>in vitro</i>	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1. Delineamento experimental	12
3.2. Obtenção dos ovócitos e aspiração	13
3.3. Rastreamento e seleção dos ovócitos.....	13
3.4. Maturação <i>in vitro</i>	14
3.5. Expansão do complexo cumulus oophorus (COC's).....	14
3.6. Coloração com Lacmoide	14
3.7. Análise estatística.....	15
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	18
REFERÊNCIAS	19

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) se apresenta como uma boa alternativa para a produção de animais superiores, consequentemente aumentando produtividade do plantel. O aumento está relacionado com o ganho genético proporcionado pela multiplicação de animais de alto mérito genotípico (GONÇALVES et al, 2008).

Apesar de todo o avanço da PIVE, aproximadamente 30 a 40% dos ovócitos submetidos à maturação *in vitro* alcançam o estágio embrionário de blastocisto. Dentre os possíveis fatores que determinam essa baixa eficiência da técnica, fatores intrínsecos do sistema de PIVE como a composição dos meios de maturação, fecundação, cultivo, temperatura e atmosfera utilizadas afetam esses baixos índices. Assim, uma adequada maturação *in vitro* (MIV) se torna essencial para proporcionar ao gameta a capacidade de maturação citoplasmática e nuclear, tendo como consequência, uma melhora na competência ovocitária (GOTTARDI e MINGOTI, 2009; LONERGAN e FAIR, 2008; CAIXETA e DODE, 2010).

Diversas são as suplementações que, quando presentes nos meios de MIV e no de cultivo *in vitro* (CIV), podem alterar taxas de clivagem e produção de blastocistos. Uma das alternativas é o uso de antioxidantes, que tem como principal função regular a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) oriundos do metabolismo aeróbio. Tal regulação é necessária, visto que metabólitos dos EROS possuem alta capacidade de interagir com o DNA, causando, assim, quebras e modificações que acarretam mudanças consideráveis nas taxas de apoptose e expressão gênica. Outro importante efeito dos EROS é sua interação com lipídeos, acarretando um processo de lipoperoxidação que causa problemas principalmente na conformação e permeabilidade de membranas celulares, tendo como desfecho a apoptose e parada no desenvolvimento embrionário. Portanto, há uma demanda em buscar compostos mais eficientes, estáveis, seguros e não tóxicos para a suplementação de meios já utilizados (ANDRADE et. al, 2010; FIDELIS, 2020; LEITE e SARNI, 2003).

A insulina transferrina selênio (ITS) é um complexo que usa da ação individual de seus componentes para diferentes efeitos, entre eles, regular a produção de ERO's. A insulina possui ação moduladora para a síntese de ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos, além de regular algumas funções celulares (VEDELER et al., 1991). A transferrina é um transportador de ferro intracelular e possui ação removedora de íons metálicos do meio, também sendo

usado como estimulante de proliferação celular (EKBLUM, 1984; BARNES e SATO, 1980). Já o Selênio realiza ampla ação antioxidante, reduzindo a quantidade de radicais livres, além de ser parte integrante da enzima glutathiona peroxidase, um potente agente antioxidante (EBERT et al., 2006; GRONBAEK et al., 1995). Assim, o ITS se mostra como uma alternativa para melhorar as condições do meio de MIV, gerando assim um aumento na taxa de maturação dos ovócitos.

O objetivo do proposto trabalho foi avaliar o efeito da suplementação do ITS na MIV na maturação nuclear de ovócitos bovinos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Maturação *in vitro* de ovócitos

Retidos no estágio de diplóteno da prófase 1 desde a vida fetal do animal, a retomada da meiose dos ovócitos só acontece pelo estímulo gerado a partir do pico do hormônio luteinizante (LH) ou com a retirada do ovócito de dentro do folículo. Portanto, os ovócitos aspirados ainda são imaturos e precisam do processo de maturação para poderem ser fecundados e, partir de então, se desenvolverem ao estágio de blastocisto (CAIXETA E DODE, 2010; GONÇALVES et al. 2008; MELLO e et al, 2016).

Nessa etapa de maturação, os ovócitos passam por diversos processos nucleares (como a retomada da meiose, ruptura da vesícula germinativa, reorganização da rede de microtúbulos, condensação dos cromossomos) e processos citoplasmáticos, como uma realocação dos grânulos corticais próximos a membrana plasmática, reprogramação na síntese proteica, mudanças na atividade da proteína quinase ativada por mitógenos (*mitogen-activated protein kinase* (MAPK)) e do fator promotor da maturação (*maturation-promoting fator* (MPF)), desenvolvimento dos mecanismos de liberação de Ca^{2+} , aquisição da capacidade de descondensar a cabeça do espermatozoides, desenvolvimento dos estoques de lipídeos, redução do aparelho de Golgi, redistribuição de ribossomos e rearranjos das mitocôndrias, além de uma estocagem de proteínas e transcritos, fundamentais para o desenvolvimento embrionário inicial (FERREIRA et al. 2009; GONÇALVES et al, 2008; VARAGO et al. 2008).

A etapa de maturação ocorre num período de 18 a 24 horas onde também acontecem algumas mudanças no *complexo cumulus oophorus* (COC's). Tais células estão ligadas ao ovócito e estão relacionadas com passagem de metabólitos, íons e aminoácidos que participam como reguladores da maturação. O COC passa por um crescimento e expansão, no qual ele se expande por meio da secreção de ácido hialurônico (FAIR, 2003; GONÇALVES et al. 2008; KRISHER, 2004; MELLO e et al, 2016; VARAGO et al. 2008;)

2.2. Fatores que influenciam na maturação *in vitro* de ovócitos.

Alguns fatores presentes na produção *in vitro* influenciam na maturação do ovócito e conseqüentemente na capacidade de fecundação e desenvolvimento embrionário, são eles: atmosfera gasosa, meio de cultivos, temperatura, suplementação proteica, fatores de crescimento (MELLO et al, 2016; CAIXETA E DODE, 2010)

Os meios de maturação podem ser suplementados com antioxidantes, fatores de crescimento e hormônios, com o intuito de incrementar as taxas de maturação e desenvolvimento embrionário como o *epidermal growth factor* (EGF), cisteamina, hormônio folículo-estimulante (FSH) e o LH. As suplementações proteicas do meio de maturação mais utilizadas são o soro fetal bovino (SFB) e com albumina sérica bovina, BSA (OLIVEIRA et al, 2019; TETZNER, 2007; VARAGO et al, 2008).

A tensão de oxigênio, no sistema de maturação *in vitro*, é um fator que influencia a produção de embriões. A alta tensão de oxigênio (20% de O₂) está ligada a estresse oxidativo e conseqüentemente alterações citogenéticas. A tensão mais utilizada para produção de embriões bovinos é a de 5% de O₂ (Banwell et al., 2007). Durante a maturação e cultivo *in vitro* são produzidos radicais livres que prejudicam o desenvolvimento e maturação, dessa forma uma alternativa para melhorar taxas de maturação e desenvolvimento de ovócitos e embriões é o uso de antioxidantes em seus respectivos meios, que irão auxiliar na proteção das estruturas contra o estresse oxidativo e radicais livres que ocorre nas produções *in vitro* (FIDELIS, 2020).

2.2.1. Estresse oxidativo e produção de espécies reativas de oxigênio

Radicais livres são moléculas que, além de geradas naturalmente pelo metabolismo celular, possuem funções importantes na transdução de sinais intracelulares, principalmente ligadas ao controle do ciclo celular, diferenciação e apoptose (SIES, 2017).

O oxigênio possui alta reatividade devido a sua conformação eletrônica. Tal reatividade o torna um dos principais entregadores das moléculas reativas, tais como o radical superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) o radical hidroxila (OH) (MENEZO, 2016; FIDELIS, 2020). Com a ocorrência do metabolismo aeróbico, muitas vezes o oxigênio destinado a esse

processo, interage com outras moléculas relacionadas a cadeia transportadora de elétrons de processos mitocondriais e no retículo endoplasmático formando OH. Assim o H₂O₂ e o O₂⁻ também são citotóxicos, uma vez que grande parte da sua conversão se dá em OH. O radical hidroxila possui alta capacidade de interagir com o DNA, assim causando quebras e modificações, que acarretam mudanças consideráveis nas taxas de apoptose e expressão gênica (FIDELIS, 2020; LEITE e SARNI, 2003).

2.3. Uso de antioxidantes na maturação *in vitro*

Antioxidantes são amplamente relacionados a moléculas com capacidade inibitiva da oxidação de outras moléculas, moléculas que reduzem o estresse oxidativo gerado pelas ERO's. Tais agentes podem ser classificados como enzimáticos e não enzimáticos, são principalmente enzimas, aminoácidos, substratos energéticos que agem de duas principais formas. Os “scavengers” que sequestram as moléculas reativas e os “quenchers”, que muitas vezes não possuem ação bem elucidada, mas estão relacionados com o fornecimento de um substrato oxidativo (HOSAKA et al. 2005).

Uma vez determinado que é necessário o uso de antioxidantes na produção devido a inexistência ou ineficiência das defesas contra radicais livres e melhores taxas embrionárias, se torna necessário buscar compostos com a menor agressividade o possível em relação aos embriões (CHWA et al., 2006). A cisteamina por exemplo, é muito utilizada como suplementação do meio de maturação em muitas produções, ela age aumentando a produção de glutathione (GSH) um antioxidante natural presente no ovócito muito importante no combate de espécies reativas de oxigênio (Oyamada e Fukui, 2004). Merton et al (2013), avaliou que a presença de cisteamina no meio de maturação aumenta os níveis de glutathione e as taxas de produção de embriões, consequentemente melhora a competência ovocitária. Além da cisteamina, podem ser utilizados no meio de maturação a Vitamina E e o ácido ascórbico, que também possuem ação antioxidantes (Olson e Seidel, 2000).

2.4. Uso de ITS na maturação *in vitro*

O ITS, a combinação de insulina-transferrina-selênio, vem sendo estudado como antioxidante para uso em meios de maturação e de cultivo, reduzindo a síntese de radicais livres e peroxidação de lipídeos (Kim, et al., 2005; Lee, et al., 2005).

A insulina, um hormônio peptídeo, atua impulsionando a produção de DNA e RNA, proteínas e lipídeos, tendo uma importante atividade mitogênica e regulando mecanismos celulares (Acevedo et al., 2007). Em alguns estudos como (Ocaña et al. 1998) mostrou que o uso da insulina na maturação *in vitro* de embriões bovinos e humanos, aumentou as taxas de ovócitos maturados, conseqüentemente maior taxa de fecundação e clivagem.

A transferrina no meio de cultivo celular atua na desintoxicação de metais tóxicos, além de ser uma molécula carreadora de ferro e possuir ação estimulante na proliferação celular (Ekblom, 1984).

O selênio é um fundamental elemento que em cultivo celular atua como antioxidante reduzindo as taxas de radicais livres gerados pelo estresse oxidativo presente no ambiente artificial, além de diminuir a peroxidação de lipídeos. Além disso ele age indiretamente prevenindo os danos causados pelo estresse oxidativo, fazendo parte da composição do sítio ativo da Glutathione peroxidase, impedindo que as espécies reativas de oxigênio cheguem ao seu alvo (Tatemoto et al., 2004; FIDELIS, 2020).

Hammami et al (2013) testaram o efeito do ITS junto com L-ácido Ascórbico (AA) e alguns hormônios como LH, FSH e 17- β estradiol, em vários níveis durante a maturação *in vitro* de ovócitos de cabras pré-púberes quanto à produção e qualidade de blastocistos. Durante as 12 primeiras horas de maturação, os ovócitos mantiveram a qualidade dos blastocistos, aumentando assim sua tolerância e sobrevivência ao processo de criopreservação, porém não houve diferença entre a quantidade de blastocistos produzidos.

Já de acordo com Jeong et al (2008), a adição de 10mg/L de insulina, 5mg/L de transferrina e 5,5mg/L de selênio no meio de maturação *in vitro* junto com ácido poli vinílico (PVA) e/ou líquido folicular de suíno incrementaram a capacidade dos ovócitos de formarem pro núcleos masculinos e, ainda, o desenvolvimento embrionário na produção *in vitro* e na produção de embriões por transferência nuclear.

3. MATERIAIS E METÓDOS

O presente experimento foi realizado no prédio de biotecnologia da EMBRAPA Cenargen, nos laboratórios de reprodução animal.

3.1. Delineamento experimental

No proposto trabalho foram feitos quatro tratamentos do meio de maturação para testar a suplementação do ITS no meio de maturação como uma alternativa para aumentar as taxas de maturação ovocitária. O primeiro tratamento utilizado foi o meio de maturação padrão do laboratório de reprodução animal da Embrapa Cenargen sem nenhum antioxidante, como controle. O segundo foi o meio de maturação padrão do laboratório de reprodução animal da Embrapa Cenargen composto com cisteamina. O terceiro tratamento foi o meio de maturação padrão do laboratório de reprodução animal da Embrapa Cenargen com a presença de ITS. E quarto e último tratamento, meio de maturação padrão do laboratório de reprodução animal da Embrapa Cenargen sem a presença de cisteamina e com a presença de ITS.

Os parâmetros de avaliação de maturação dos ovócitos que foram utilizados foi a mensuração das áreas do COC antes e depois da maturação e a coloração com Lacmoide, onde foi possível visualizar as placas metafásicas onde os ovócitos se encontravam. O correto é que quando maturados, os ovócitos se encontram estacionados em metáfase II da meiose.

Experimento 1: Avaliação da mensuração da área dos ovócitos antes e depois da maturação com os tratamentos do meio de maturação.

Nesse experimento foi registrado fotos dos ovócitos antes e depois da maturação com seus devidos tratamentos. Após o registro foi feita a mensuração das áreas do COC e em seguida a média das áreas de cada tratamento para avaliar se a presença do ITS no meio de maturação influenciava na expansão do COC.

Experimento 2: Avaliação da cinética de maturação nuclear dos ovócitos com os tratamentos do meio de maturação.

Nesse experimento foi visualizado a placa metafásica a partir da coloração com Lacmoide de cada ovócito dos quatro tratamentos proposto. Sendo possível avaliar se o tratamento com

a presença de ITS ou não influenciava na maturação nuclear dos ovócitos e conseqüentemente a competência ovocitária e desenvolvimento de um possível embrião.

3.2. Obtenção dos ovócitos e aspiração

Os ovários usados para a obtenção dos ovócitos foram oriundos de um abatedouro de Anápolis – GO. Os ovários foram transportados durante a viagem em banho maria, temperatura de 35°C. Logo após a chegada dos mesmos ao laboratório, os ovários foram lavados com solução salina à 0,9%, suplementado com antibióticos penicilina e estreptomicina, aquecida a 32-36°C e logo após a lavagem foram armazenados em um recipiente de vidro estéril, contendo essa mesma solução, onde permaneceram até o fim da aspiração em banho maria nesta mesma temperatura. Todo o processo do transporte à aspiração e finalmente a colocação dos ovócitos puncionados em maturação foram feitos no intervalo de 4-6 horas.

3.3. Rastreamento e seleção dos ovócitos

Após a aspiração, foi feito o rastreamento e seleção dos ovócitos. Aguardado 10 minutos para sedimentação dos ovócitos e formação do pellet no fundo do tubo, foi retirado com o auxílio de uma pipeta sorológica o líquido folicular ou sobrenadante e colocado em outro tubo. Esse líquido foi centrifugado à 37°C, a 700g por 5 minutos. Enquanto isso o pellet foi mantido em banho maria à 37°C. Em uma placa de Petri de 60mm foi colocado o pellet e cerca de 10mL do líquido folicular centrifugado para que os ovócitos fossem rastreados com o auxílio da lupa e manipulados com a pipeta de vidro e bulbo. Os ovócitos encontrados foram colocados em outra placa de Petri de 35mm contendo de 2-3mL de líquido folicular.

Após o rastreamento os ovócitos encontrados foram selecionados quanto à qualidade, avaliando a uniformidade do citoplasma e quantidade e aparência do COC's, de acordo com CAIXETA E DODE, 2010. Apenas ovócitos de grau 1 a 3 foram utilizados, ovócitos de grau 4 foram descartados. Após a seleção, os ovócitos foram agrupados em grupos de 25 a 30 por gota.

Antes de transferi-los para as gotas de maturação, foi dado um banho em cada grupo como o próprio meio de maturação de acordo com o tratamento para cada grupo. Após isso os

ovócitos foram transferidos para suas respectivas gotas de maturação, contendo 150µL do meio de maturação de cada tratamento, imersas sob óleo mineral em uma placa de Petri de 60mm.

3.4. Maturação *in vitro*.

O meio de maturação (MIV) padrão da Embrapa Cenargen, do qual foi utilizado na realização do experimento consiste de TCM 199 com sais de Earl's suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 0,01 UI/mL de hormônio folículo estimulantes (FSH), 0,1mg/mL de L-glutamina, 0,1µg/mL de cisteamina e 0,0755mg/mL de sulfato de amicacina. Nos tratamentos que haviam a presença de ITS foi adicionado 0,5µg de ITS a cada mL de meio de maturação já pronto.

Os quatro tratamentos utilizados do meio de MIV para o experimento ficaram armazenados à 4°C até o dia do uso. No dia do uso do meio foi separado em eppendorf a quantidade necessária para ser usada, e posta para estabilizar por no mínimo 2 horas antes do uso na estufa de estabilização. Com isso os ovócitos permaneceram nas gotas de maturação de 150 µL, por 22 horas, à 38,8°C e com 5% de CO₂ em ar.

3.5. Expansão do complexo cumulus oophorus (COC's)

Para determinar a expansão do complexo cumulus oophorus (COC's) de cada tratamento foi utilizado o programa Nikon Digital Sight DS-L3. A mensuração da área dos ovócitos antes e depois da maturação foi realizada pelo programa ImageJ. Foi realizada a diferença entre a média de todas as áreas das células do cumulus, de cada tratamento, antes e depois da maturação *in vitro*.

3.6. Coloração com Lacmoide

Após as 22 horas de maturação dos devidos tratamentos os ovócitos foram desnudados e colocados em meio de fixação por mais 48 horas. O meio de fixação é composto por metanol e ácido acético em uma proporção de 2:1. Após as 48 horas em meio de fixação os ovócitos foram corados com a solução de Lacmoide, onde é possível visualizar estágios específicos da maturação nuclear de ovócitos bovinos. 100mL da solução corante de Lacmoide é composto por 5g de Lacmoide, 45mL de ácido acético e 55mL de água destilada, após a diluição de todos

componente foi feito uma filtração da solução corante com filtro de café. Os materiais utilizados para a coloração foram:

Com a ajuda de uma pipeta de vidro com o bulbo e visualizando-os com o auxílio de uma lupa, os ovócitos já previamente fixados foram colocados em uma lâmina e tampados com uma lamínula com vaselina, na ponta de dois lados opostos para não amassar os ovócitos. Com o auxílio de um papel toalha, criando um sistema corrente na lâmina, os ovócitos são lavados com a solução corante de Lacmoide, e em seguida lavados novamente com solução de fixação. Após secar a lâmina com um papel toalha foi feito a vedação da lâmina com esmalte, passando o esmalte nas laterais onde não há vaselina nas pontas. Com a lâmina pronta foi visualizado com o auxílio de um microscópio, as placas metafásicas onde os ovócitos de encontravam.

3.7. Análise estatística

Os dados de fase da meiose relativo à maturação nuclear de cada grupo foi analisado pelo teste de Chi-quadrado (independência) e a média de área dos oócitos antes e após MIV foi analisado pelo teste de Kruskal-Wallis, ambos utilizando 5% de significância ($p=0,05$). As avaliações estatísticas foram feitas no programa "R Studio", versão 4.0.4, 2021.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro experimento proposto, o grupo tratado com ITS e o grupo tratado com ITS + cisteamina demonstrou uma maior taxa de expansão das células do cumulus em relação aos demais grupos, conforme demonstrado na tabela 1.

Tabela 1: Mensuração da área do COC antes (pré) e depois (pós) da maturação *in vitro* (MIV) submetidos a diferentes meios de maturação, suplementados com antioxidantes.

Tratamentos	Ovócitos (N)	Média da área do COC pré-MIV	Média da área do COC pós-MIV
MIV -ITS +CIS	106	0,130±0,095	0,431±0,344 ^a
CONTROLE	98	0,129±0,085	0,436±0,296 ^a
MIV +ITS -CIS	110	0,152±0,133	0,375±0,274 ^b
MIV +ITS +CIS	100	0,127±0,063	0,385±0,270 ^{ab}

Dados avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis. Letras distintas na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$).

MIV: Maturação *in vitro*

ITS: Insulina transferrina selênio

CIS: Cisteamina

Embora a expansão do COC seja um processo relativamente fácil de se reproduzir *in vitro* ainda não se sabe o significado dessa expansão *in vitro*, visto que ainda há controvérsias desse processo em relação a maturação ovocitária e da aquisição de competência. Portanto há a necessidade de uma averiguação nuclear para confirmar se houve maturação ou não, o que condiz com achados na literatura (CAIXETA E DODE, 2010;)

No segundo experimento foi avaliada a influência dos diferentes tratamentos na cinética de maturação nuclear dos ovócitos. Os ovócitos foram classificados de acordo com o estágio da meiose que se encontravam: vesícula germinativa (VG), quando o envoltório da vesícula estiver intacto e a cromatina estiver descondensada, vesícula germinativa rompida (VGBD) quando o envoltório da vesícula estiver rompido em qualquer ponto e a cromatina estiver condensada, metáfase I (MI), anáfase I (AI), telófase I (TI) e metáfase II (MII) com a presença do corpúsculo polar (CP). No entanto foram considerados ovócitos anormais aqueles que apresentaram algum tipo de aberração cromossômica, degeneração e cromatinas difusas e/ou indefinidas. O teste estatístico realizado mostrou que não houve diferença significativa entre os tratamentos realizados, como descrito na Tabela 2, abaixo. Portanto, o uso de ITS no meio de maturação não influencia em uma melhor taxa de maturação de ovócitos e conseqüentemente na competência ovocitária.

Tabela 2: Cinética de maturação nuclear de ovócitos submetidos a MIV com suplementação de diferentes antioxidantes.

Tratamentos	TOTAL	VG	VGBD	MI	AI	TI	MII	ANORMAIS
MIV -ITS +CIS	65	1	0	4	0	3	54	3
CONTROLE	59	0	0	1	0	2	53	3
MIV +ITS -CIS	57	2	1	1	3	5	39	6
MIV +ITS +CIS	55	1	0	2	2	4	42	4

VG: vesícula germinativa; VGBD: Vesícula germinativa rompida; MI: metáfase I; AI: anáfase I; TI: Telófase I; MII: Metáfase II. Dados avaliados pelo teste Chi-quadrado ($p < 0,05$).

Pereira (2013) mostrou que a presença de ITS associado ao L-ácido Ascórbico (AA) durante diferentes horas de maturação (0, 8 e 24 horas) e diferentes tamanhos de folículos (1-3 e 6-8) não melhorou as taxas de competência dos ovócitos, porquanto não houve interferência a nível molecular. Após 24 horas de maturação todos os ovócitos, independente do grupo, tinham em torno de 90% dos seus ovócitos em estágio de metáfase II. Apenas houve melhora no desenvolvimento embrionário de ovócitos maturados com a suplementação de ITS e AA na maturação *in vitro*.

Já Córdova (2010) relatou que não houve diferença estatística na presença de ITS e/ou ácido L-ascórbico por 12h no meio de maturação em comparação aos controles que tem em sua composição apenas o TCM. No entanto, a presença de ITS e/ou ácido L-ascórbico por 24h, obteve taxas mais baixas de ovócitos que atingiram metáfase II em comparação com ovócitos de controle.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que a presença do ITS por si só no meio de maturação *in vitro*, não foi suficiente para melhorar a taxa de maturação nuclear de ovócitos e conseqüentemente competência ovocitária. Portanto há uma necessidade de mais estudos para avaliar outras vias e associações em que o ITS poderia ser funcional, bem como na produção e qualidade de embriões, tanto no cultivo quanto na maturação, ou nos dois.

REFERÊNCIAS

- Acevedo, N., Ding, J.; Smith, G. **Insulin signaling in mouse oocytes**. *Biology Reproduction*, v.77, p.872-879, 2007.
- Ahumada, C. J.; Salvador, I.; Cebrian-Serrano, A.; Lopera, R.; Silvestre, M. A. **Effect of supplementation of different growth factors in embryo culture medium with a small number of bovine embryos on in vitro embryo development and quality**. *Animal*, v. 7, p.455-462. 2013.
- Andrade, E. R., Melo-Sterza, F. A., Seneda, M. M., Alfieri, A. A. **Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes**. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.34, n.2, p.79-85, abr./jun. 2010
- Banwell, K. M., Lane, M., Russell, D. L., Kind, K. L., Thompson, J. G. **Oxygen concentration during mouse oocyte maturation affects embryo and fetal development**. *Human Reproduction*, v.22, p.2768-2775, 2007
- Barnes, D.; Sato, G. **Methods for growth of cultured cells in serum medium**. *Analytical Biochemistry*, v.102, p.255-270, 1980
- Caixeta, E. S. e Dode, M. A. N. **Avaliações da competência ovocitária em bovinos**. *Vet e Zootec*. Março de 2010. Pág 8-18.
- Chui, d. K., pugh, n. D., walker, s. M., gregory, l., shaw, r. W. **Follicular vascularity the predictive value of transvaginal power Doppler ultrasonography in an in vitro fertilization programme: a preliminary study**. *Human Reproduction*, v.12, p.191-196, 1997.
- 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**. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v.47, p.1902–1910, 2006.
- Cordova, b.; morato, r.; izquierdo, d.; paramio, t.; mogas, T. **Effect of the addition of insulin-transferrin-selenium and/or L-ascorbic acid to the in vitro maturation of prepubertal bovine oocytes on cytoplasmic maturation and embryo development**. *Theriogenology*, v. 74, p.1341–1348, 2010.
- Ebert, R.; Ulmer, M.; Zeck, S.; Meissner-Weigl, J.; Schneider, D.; Stopeer, H.; Schupp, N.; Kasseem, M.; Jakob F. **Selenium supplementation restores the antioxidative capacity and prevents cell damage in bone marrow stromal cells in vitro**. *Stem Cells*, v. 24, p.1226-1235, 2006.
- Ekblom, P. **Basement membrane proteins and growth factors in kidney differentiation**. In: **Trelstad, RL, The role of extracellular matrix in development**. Liss A.R, New York, p.173-206, 1984.
- Fair, T. **Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence**. *Animal Reproduction Science*, v. 78, p. 203-216, 2003.
- Fidelis, A. A. G., Siqueira Filho, E., Leme, L., Ramiro Júnior, E., Leme A., Rumpf, R., Franco M. M. **Antioxidantes associados à pressão hidrostática sobre a viabilidade embrionária pós-desvitrificação**. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.38, p. 60-66. Belo Horizonte, 2014.

Fidelis, A. A. G. **Extrato etanólico de plantas do cerrado na produção in vitro de embriões bovinos**. Tese de Doutorado. 89p. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2020.

Ferreira, E. M.; Vireque, A. A.; Adona, P. R.; Meirelles F. V.; Ferriani, R. A.; Navarro, P. A. A. S. **Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence**. Theriogenology, v. 71, p. 836-848, 2009.

Gonçalves, P. B. D., De Figueiredo, J. R., Freitas, V. J. F. (ed.). **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. ROCCA, 2008. 395 p. ISBN 8572417443.

Gottardi, F. P., Mingoti, G. Z. **Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião**. Revista Brasileira Reprodução Animal, Belo Horizonte, v.33, n.2, p.82-94, abr./jun. 2009.

Gronbaek, H.; Frystyk, J.; Orskov, H.; Flyvbjerg, A. **Effect of sodium selenite on growth, insulin-like growth factor binding proteins and insulin-like growth factor in rats**. Journal of Andrology, v.145, p.105-112, 1995.

Hammami, S.; Morato, R.; Romaguera, R.; Roura, M.; Catala, M. G.; Paramio, M. T.; Mogas, T.; Izquierdo, D. **Developmental competence and embryo quality of small oocytes from pre-pubertal goats cultured in ivm medium supplemented with low level of hormones, insulin–transferrin–selenium and ascorbic acid**. Reproduction in Domestic Animals, v. 48, p.339–344, 2013.

Hosaka, S., Obuki, M., Nkajima, J. Suzuki, M. **Comparative study of antioxidants as quenchers or scavengers of reactive oxygen species based on quenching of MCLA-dependent chemiluminescence**. Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Tokyo Polytechnic University, 1583 Atsugi, Kanagawa 243-0297, Japan, 2005.

Jeong, Y. W.; Hossein, M. S.; Bhandari, D. P.; Kim, Y. W.; Kim, J. H.; Park, S. W.; Lee, E.; Park, S. M.; Jeong, Y. I.; Lee, J. Y.; Kim, S.; Hwang, W. S. **Effects of insulin– transferrin–selenium in defined and porcine follicular fluid supplemented IVM media on porcine IVF and SCNT embryo production**. Animal Reproduction Science, v.106, p.13–24, 2008.

Kim, S.; Lee, G. S.; Lee, S. H.; Kim, H. S.; Jeong, Y. W.; Kim, J. H.; Kang, S. K.; Lee, B. C.; Hwang, W. S. **Embryotropic effect of insulin-like growth factor (IGF)-I and its receptor on development of porcine preimplantation embryos produced by in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer**. Molecular Reproduction and Development, v.72, p.88–97, 2005.

Krisher, R. L. **The effect of oocyte quality on development**. Journal Animal Science, v. 82, p. 14-23, 2004.

Lee, M. S.; Kang, S. K.; Lee, B. C.; Hwang, W. S. **The beneficial effects of insulin and metformin on in vitro developmental potential of porcine oocytes and embryos**. Biology of Reproduction, v.73, p.1264–1268, 2005.

Leite, H. P.; Sarni, R. S. **Radicais livres, antioxidantes e nutrição**. Revista Brasileira de Nutrição Clínica, v. 18, n. 2, p. 87-94, 2003.

Lonergan, P., Fair, T. **In vitro-produced bovine embryos: Dealing with the warts**. Theriogenology, v.69, p.17-22, 2008.

Mello, R. R. C., J. E. Ferreira, S. L. G. de Sousa, M. R. B. de Mello, H. B. Palhano. **Produção in vitro (PIV) de embriões em bovinos.** Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.40, n.2, p.58-64, abr./jun. 2016

Menezo, Y. J., E. Silvestris, B. Dale and K. Elder. **Oxidative stress and alterations in DNA methylation: two sides of the same coin in reproduction.**" *Reprod Biomed Online*. 2016.

Merton, J. S.; Knijn, H. M.; Flapper, H.; Dotinga, F.; Roelen, B. A. J.; Vos, P. L. A. M.; Mullaart, E. **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. 71, p.1–7, 2013.

Ocana, Q. J. M.; Pinedo, M. M.; Ortega, M. M.; Moreno, M. M. **Influence of human and bovine insulin on in vitro maturation, fertilization and cleavage rates of bovine oocytes.** *Archivos de Zootecnia*, v.47, p.85–93, 1998.

Oliveira, A. R. da SILVA; Santos, M. V. de OLIVEIRA; de OLIVEIRA, L. R.M; PEREIRA, A. F. **Efeito da associação do fator de crescimento epidermal com cisteamina durante a maturação in vitro de oócitos bovinos.** IV congresso internacional das Ciências agrárias – COINTER – PDVAgro. 2019.

Olson, S. E. and G. E. Seidel, Jr. (2000). **Culture of in vitro-produced bovine embryos with vitamin E improves development in vitro and after transfer to recipients.** *Biol Reprod* 62(2): 248-252.

Oyamada, T.; Fukui, Y. **Oxygen tension and medium supplements for in vitro maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium.** *Journal of Reproduction and Development*, v.50, p.107-117, 2004.

Pereira, S. A. **Efeito da Presença da Insulina-Transferrina-Selênio (ITS) e L-ácido Ascórbico (AA) na Produção in vitro de Embriões Bovinos.** Dissertação de mestrado. 87p. Programa de pós graduação em Biologia animal, Universidade de Brasília, 2013.

Sirard, M. A. **Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence.** *Theriogenology*. 2001; 55: 1241-1254
Sies, H. **Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress.**" *Redox Biol* v.11: p.613-619, 2017.

Tetzner, T. A. D. **Efeitos da substituição do soro fetal bovino (sfb) e da albumina sérica bovina (bsa) pela ovalbumina (ova) na produção in vitro de embriões bovinos.** Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007.

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.** *Revista Brasileira de reprodução animal*, Belo Horizonte, v.32 n.2, p100-109, abr/jun 2008.

Vedeler, A.; Pryme, L. F.; Hesketh, J. E. **Insulin induces changes in the sub cellular distribution of actin and S-nucleotidase.** *Molecular and Cellular Biochemistry*, v.108, p.67-74, 1991.

Viana, J. H. M., Figueiredo, A. C. S, Gonçalves,R. L. R, Siqueira, L. G. B. **A historical perspective of embryo-related technologies in South America.** *Proceedings of the 10th*

International Ruminant Reproduction Symposium; Foz do Iguaçu, PR, Brazil, September 16th to 20th, 2018.