



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE
RUMINANTES
ÁREA DE REPRODUÇÃO ANIMAL

**EFEITO DA CANTAXANTINA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE
EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO***

ELIZABETE JULIA DA SILVA

Garanhuns, 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE
RUMINANTES

ELIZABETE JULIA DA SILVA

**EFEITO DA CANTAXANTINA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE
EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes, da Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Sanidade e Reprodução de Ruminantes.

Orientador: Cláudio Coutinho Bartolomeu

Garanhuns, 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO – UFRPE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE
RUMINANTES – PGSRR

EFEITO DA CANTAXANTINA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE
EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

Dissertação elaborada por
ELIZABETE JULIA DA SILVA

Aprovada em 01/08/2016

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cláudio Coutinho Bartolomeu
Presidente da Banca – Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE

Prof. Dr. André Mariano Batista
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Dr. Antônio Santana dos Santos Filho
Instituto Agrônômico de Pernambuco – IPA

DEDICATÓRIA

Mãe, jamais poderia dedicar este trabalho a alguém diferente. Jamais deixarei de agradecer por tudo que fizeste por mim e pelo ser humano que me tornei, seguindo os teus ensinamentos. À pessoa mais importante da minha vida, àquela que jamais sentirei amor igual. A dor da ausência é grande, mas a força que deixastes em mim, me fez/faz continuar. Agora, um pouco mais forte e carregando a tua neta em meu ventre, eu te dedico, minha mainha...

À Josicleide da Silva Carlos (in memorian),
minha saudade eterna.

AGRADECIMENTOS

É Deus quem nos dá a capacidade para escolher o melhor caminho, nos ajuda a enfrentar nossas jornadas, nos guiando e nos dando sabedoria para lidar com as intempéries que surgem. A Ele, meu agradecimento primordial.

À minha família, Mãe (in memorian), Pai, Irmão, avós (in memorian), avôs, tios, tias, primos, primas, meu padrinho, sogros, cunhada e cunhado... são base, são refúgios, são chão.

Ao grande amor da minha vida, meu melhor amigo e eterno companheiro, o qual escolhi para habitar meu coração e ser o melhor pai que a minha filha poderia ter, Max Santini.

À minha filha Eloah (a neta tão sonhada de mainha), que chegou em minha vida para dar um novo sentido e me fazer lembrar o que é valorizar a vida.

Àqueles que posso chamar de amigos, os quais guardo as melhores lembranças, que se fizeram presentes de alguma forma nesta minha caminhada, e não tenho dúvida que são para sempre... esses, citarei em ordem alfabética, para não priorizar ninguém (rsrsrs): Alice, Alexandre, Ana Kássia, Bárbara, Gyllhemberg, Carina, Ceciliane, Cláudia, Denize, Elizabete, Elizabeth, Flávio, Giselli, Hiran, Iracy, Janaina, Jamesson, Jefferson, Jô, Jullie Ane, Kleber, Lais, Mabel, Mayumi, Marília, Natália, Pábola, Rafael, Renata, Rita, Roseana, Simone, Tatiana, Vanessa, Viviane, Wasim.

Ao meu querido amigo e admirável orientador, Cláudio Coutinho, por todo exemplo de profissional e pessoa, disponibilidade, apoio, conhecimento, braços abertos e incentivo, para que eu conseguisse me superar a cada dia.

Ao grande homem que se tornou um amigo, que carinhosamente chamo de meu pai do IPA, Antônio Santana, pelos sorrisos misturados à muito profissionalismo. Sem seu apoio, eu jamais teria chegado aonde cheguei.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco, e todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes, pelo conhecimento dividido, em especial, Gustavo Ferrer, José Wilton e Daniela Oliveira. A todos do ANDROLAB, em especial, André Mariano, pela paciência, apoio, incentivo e risadas, que me aliviaram as tensões em muitos momentos. Aos técnicos do departamento, em especial, o sempre querido Alcir.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), assim como, ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), pelo apoio financeiro para grande parte deste estudo.

Meu muito obrigada, de coração!

RESUMO

A Fertilização *in vitro* (FIV) é a técnica utilizada para produzir embriões no laboratório, seguindo etapas que são necessárias para o seu estabelecimento, com a finalidade de obter embriões aptos para a transferência. Dentre as etapas da FIV, o cultivo *in vitro* (CIV) é de extrema importância, para que os embriões possam se estabelecer em um meio viável ao seu desenvolvimento. Diante do exposto, o objetivo deste experimento é avaliar o efeito da cantaxantina adicionada ao meio de cultivo na produção *in vitro* de embriões, produzidos a partir do sêmen congelado convencional, de touro da raça 5/8 Girolando. Para a realização do experimento foram utilizados ovários bovinos colhidos no matadouro imediatamente após o abate, e selecionados oócitos classificados como qualidade 1 e 2, que seguiram para maturação por 24h. A FIV dos oócitos maturados foi feita com sêmen convencional congelado, ficando incubados por 18h, antes de serem colocadas para o Cultivo, seguindo a descrição a seguir: Grupo Controle (C) – Sem adição de cantaxantina; Tratamento 1 (T1) – Adição de 1mM de cantaxantina; Tratamento 2 (T2) – Adição de 0,5mM de cantaxantina; Tratamento 3 (T3) – Adição de 0,25mM de cantaxantina. No Dia 3 e 8, após o Dia 0 (dia da FIV), foram avaliadas as taxas de clivagem e taxa de blastocisto, respectivamente. Foram encontradas diferenças significativas nas taxas de blastocistos e na qualidade embrionária, quando comparamos as diferentes concentrações de cantaxantina utilizadas.

Palavras-chaves: bovinos; 5/8 Girolando; FIV; CIV; cantaxantina

ABSTRACT

In vitro fertilization (IVF) is the technique used to produce embryos in the laboratory, following steps that are necessary for its establishment, in order to obtain embryos suitable for transfer. Among the IVF stages, *in vitro* culture is extremely important, so that the embryos can be established in a viable medium to their development. In view of the above mentioned, the objective of this experiment is to evaluate the effect of Canthaxanthin added to the culture medium on the *in vitro* embryo production produced from conventional frozen semen of 5/8 Girolando bull. To perform the experiment, bovine ovaries were harvested at the slaughterhouse immediately after slaughter, and oocytes classified as quality 1 and 2, which were then followed for maturation for 24 hours. The IVF of the mature oocytes was done with conventional frozen semen and incubated for 18h before being placed in the culture, according to the following description: Control Group (C) - No addition of Canthaxanthin; Treatment 1 (T1) - Addition of 1 mM of Canthaxanthin; Treatment 2 (T2) - Addition of 0.5 mM of Canthaxanthin; Treatment 3 (T3) - Addition of 0.25 mM of Canthaxanthin. On Day 3 and 8, after Day 0 (day of IVF), the cleavage and blastocyst rates, respectively, were evaluated. There were found significant differences in the rates of cleavage and blastocysts at the different concentrations of canthaxanthin used.

Key-words: cattle; 5/8 Girolando; FIV, *in vitro* Culture; Canthaxanthin.

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 - comparação das taxas de clivagem dos grupos controle e tratamentos, observadas no terceiro dia de cultivo (D3).....	34
Tabela 2 - comparação das taxas de blastocistos produzidos pelos grupos controle e tratamentos, no oitavo dia de cultivo (D8).....	35
Tabela 3 - comparação das taxas de células túnel positivo e túnel negativo.....	35

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

ASBIA – Associação Brasileira de Inseminação Artificial

C – Grupo Controle

CIV – Cultivo *in vitro*

CO₂ – Gás Carbônico

COC/CCO – Complexo Cúmulos oócito

CP – Células túnel positivas

CN – Células túnel negativas

D -1 – Dia antes da Fecundação

D0 – Dia da Fecundação

D3 – Terceiro dia após a Fecundação

D7 – Sétimo dia após a Fecundação

D8 – Oitavo dia após a Fecundação

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

FAO – Food and Agriculture Organization

FIV – Fertilização *in vitro*

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

GSH – Glutathiona

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IA – Inseminação Artificial

IPA – Instituto Agrônomo de Pernambuco

LH – Hormônio Luteinizante

mg – Miligrama

mL – Mililitros

mm – Milímetros

mM - Micromolar

MIV – Maturação *in vitro*

PBS – Solução Salina Fosfatada Tamponada

PIVE – Produção *in vitro* de Embriões

PIV – Produção *in vitro*

RL – Radicais Livres

SFB – Soro Fetal Bovino

sptz – Espermatozoides

T1 – Grupo Tratamento 1

T2 – Grupo Tratamento 2

T3 – Grupo Tratamento 3

USDA – United States Department of Agriculture

β – Beta

°C – Grau Celsius

μL – Microlitro

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Folículos sendo aspirados (Fonte pessoal).....	42
Figura 2 Líquido folicular aspirado (Fonte pessoal).....	42
Figura 3 Organização das gotas com as estruturas (Fonte pessoal).....	42
Figura 4 Gradiente de Percoll (Fonte pessoal).....	42
Figura 5 Espermatozoides capacitados ao fundo do eppendorf (Fonte pessoal)..	43
Figura 6 Oócitos maturados (Fonte pessoal).....	43
Figura 7 Cantaxantina (Fonte pessoal).....	43
Figura 8 Alguns embriões produzidos (Fonte pessoal).....	43
Figura 9 Embriões de grau 1, 2 (Fonte pessoal).....	
Figura 10 Embrião visto em microscopia eletrônica de fluorescência (Fonte pessoal).....	44
Figura 11 Embrião submetido à avaliação pelo programa imageJ para marcação e contagem celular (Fonte pessoal).....	44
Figura 12 Embrião visto em microscopia eletrônica de fluorescência, apresentando túnel positivo (Fonte pessoal).....	44

SUMÁRIO

	Página
1 - Introdução	13
2 - Objetivos.....	14
2.1 - Geral.....	14
2.2 - Específicos.....	14
3 - Revisão de Literatura.....	15
3.1 - Bovinocultura no Brasil.....	15
3.2 - Biotécnicas da Reprodução.....	15
3.3 - Produção <i>in vitro</i> (PIV)	16
3.3.1 - Fertilização <i>in vitro</i> (FIV)	17
3.3.2 - Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	18
3.4 - Cantaxantina.....	20
4 - Referências.....	21
5 - Artigo Científico.....	28
6 - Considerações Finais.....	41
7 - Apêndices.....	42

1 – Introdução

A fecundação ou fertilização se dá pelo envolvimento oócito-espermatozoide, ocasionando a formação de um novo indivíduo. Na técnica de Produção *in vitro* de embriões (PIVE), todas as etapas necessárias para que ocorra essa fecundação, acontecem em laboratório, seguindo um padrão de manipulação, a fim de se obter o melhor desenvolvimento embrionário possível. É importante saber que, o melhor desempenho da PIVE, depende também da eficácia no sistema de produção, que inclui todas as etapas do processo: Maturação *in vitro* (MIV), Fertilização *in vitro* (FIV) e o Cultivo *in vitro* (CIV) (LEIVAS, 2006).

Para que ocorra a fecundação e o embrião tenha capacidade de se desenvolver, a maturação nuclear e citoplasmática do oócito deve acontecer de forma eficiente (FERREIRA et al., 2008; GUEMRA et al., 2013), pois, somente após a conclusão desses processos, é que o oócito se torna competente para permitir o sucesso da fecundação e o desenvolvimento embrionário inicial subsequente (VARAGO, 2008).

Para que os eventos da maturação oocitária ocorram *in vitro*, é necessária a utilização de meios que mimetizem as condições encontradas durante o processo de maturação *in vivo* (SANGILD, 2000; BUENO, 2008). Muitos avanços foram obtidos com a modificação dos meios de cultivo embrionários na produção *in vitro* (PIV), o que trouxe um aumento da taxa de embriões produzidos (GUEMRA, 2013). Porém, os resultados ainda baixos, podem ser seguramente atribuídos a dois principais fatores: as condições de cultivo *in vitro* (RUSSEL et al., 2006; CHAVES et al., 2010) e a qualidade dos oócitos selecionados para a maturação *in vitro* (CAMARGO et al., 2006; CHAVES et al., 2010).

Em todas as etapas da PIV, diferentes protocolos têm sido utilizados, inclusive para o cultivo *in vitro* (GALLI, 1996; BUENO, 2008), assim, visando a importância e a necessidade de condições adequadas para um bom resultado, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da Cantaxantina adicionada ao meio de cultivo na produção *in vitro* de embriões, produzidos a partir do sêmen congelado convencional, de um touro da raça 5/8 Girolando, analisando a taxa de clivagem e a taxa de blastocisto, buscando resultados que possam enfatizar a importância das etapas que envolvem a produção *in vitro* e suas vantagens na Reprodução Animal e no desenvolvimento embrionário.

2 – Objetivos

2.1 – Geral

Avaliar o efeito da cantaxantina adicionada ao meio de cultivo na produção *in vitro* de embriões produzidos a partir do sêmen congelado convencional, de touro da raça 5/8 Girolando, através das taxas de clivagem, taxas de blastocistos e taxas obtidas pela análise do TÚNEL.

2.2 – Específicos:

- Analisar a taxa de clivagem
- Analisar a taxa de blastocisto
- Qualidade embrionária

3 - Revisão de Literatura

3.1 – Bovinocultura no Brasil

Em 2011, o Brasil passou para a primeira posição mundial em tamanho de rebanho bovino, com 212 milhões de cabeças, seguido da Índia com 210 milhões. Em 2012, o Brasil ficou atrás apenas da Índia, apresentando 211 e 218 milhões de cabeças, respectivamente, segundo dados da Food and Agriculture Organization – FAO (2016), e tornou-se o segundo maior produtor mundial e maior exportador mundial de carne bovina (IBGE, 2011; USDA, 2016).

O Brasil apresenta a maior produção de leite do mundo (SIQUEIRA, et al., 2013), atingindo 727 milhões de toneladas, incluindo leite de vaca, búfala, camelo, cabra e ovelha. O leite de vaca sozinho já respondeu por 606,7 milhões de toneladas em 2012 (EMBRAPA, 2012). Com as melhorias dos índices de produção alcançados nos últimos anos, a pecuária de corte brasileira vem ganhando destaque no cenário econômico nacional e internacional, apesar de ter sofrido uma leve baixa em 2013, em decorrência da seca.

3.2 - Biotécnicas da Reprodução

O uso de biotécnicas da reprodução tem crescido continuamente, podendo ser confirmado também, pelo aumento da comercialização de doses de sêmen (KIPPER, 2014). O mercado geral de sêmen no Brasil apresentou um crescimento de 4,49% em 2014 comparado ao ano anterior, o que significou um total de 13.609.311, diante de pouco mais de 13 milhões em 2013. Segundo os dados da Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA, 2015), também tiveram crescimento o segmento de venda de botijões, indicando claramente a entrada de novos usuários neste mercado.

O Brasil lidera a produção e transferência de embriões *in vitro*, respondendo por 68% desse mercado (NOGUEIRA et al. 2013), porém, apesar dos avanços obtidos na PIVE, e sua utilização crescente em programas de melhoramento bovino, a quantidade de embriões que atinge o estágio de blastocisto é, raramente, superior a 40% (NEVES, et al., 2010 e GOUVEIA, 2011), e isso deixa ainda mais evidente a importância de estudos utilizando oócitos recuperados de folículos de vacas abatidas, para que assim,

tenhamos uma melhor compreensão dos vários fenômenos e mecanismos biológicos que ocorrem durante todas as etapas da fertilização *in vivo* (GARCIA et al. 2002).

3.3 - Produção *in vitro* (PIV)

O ano de 2014 trouxe para o mercado de Inseminação Artificial (IA) no Brasil, diversos desafios como, intenso e longo período de seca, copa do mundo, eleições presidenciais e instabilidade econômica (ASBIA, 2014), porém, grande parte do sucesso no aumento do abate e níveis de produtividade devem-se às melhorias nos sistemas de produção, com ênfase no crescimento das biotécnicas da reprodução (NOGUEIRA et al., 2013).

Muitos elementos influenciam os resultados dos procedimentos de PIV, como origem e qualidade dos oócitos, sêmen escolhido, habilidade do técnico, entre muitas outras variáveis, podendo originar embriões de diferentes qualidades e com diferentes perspectivas de uso (NOGUEIRA et al., 2013). Devido à aspiração folicular *in vivo* e o aprimoramento da técnica e condições de cultivo *in vitro*, tornou-se viável o uso da PIV em escala comercial (BAYARD et al., 2007; SOARES, 2014).

A PIVE com ovários provenientes de abatedouros nos apresentam algumas dificuldades, como o tempo para que o material chegue ao laboratório; o desconhecimento sobre as condições sanitárias ou o padrão hormonal dos animais; a não repetibilidade da técnica para um certo animal (MARTINEZ et al., 2007). Porém, a obtenção desses oócitos, é uma ferramenta de grande valia para a pesquisa e desenvolvimento de embriões com boa morfologia para estudos *in vitro* (GONÇALVES et al., 2007; FILHO et al., 2012).

Na produção *in vitro* de embriões, são geradas espécies reativas de oxigênio (EROs), que provém da tensão de oxigênio, exposição à luz e excesso de manipulação. O equilíbrio na presença de EROs e antioxidantes é positivo para a PIV (GUERIN et al., 2001; ANDRADE et al., 2010), portanto, a adição de antioxidantes é considerado um fator importante para a PIVE, diminuindo os efeitos danosos causados pelas EROs (GUEMRA, 2013).

3.3.1 - Fertilização *in vitro* (FIV)

A Fertilização *in vitro*, depende indispensavelmente de uma boa qualidade dos oócitos selecionados e dos espermatozoides utilizados (CARVALHO NETO, 2009; GOUVEIA, 2011). O oócito pode ter o seu potencial de maturação, fecundação e capacidade de desenvolvimento embrionário estimado pela aparência do complexo cúmulus-oócito (CCO). Várias classificações morfológicas têm sido adotadas para selecionar oócitos bovinos, na tentativa de identificar os de maior viabilidade, como essa classificação feita por Leibfried & First (1979), adaptada por Gonsalves, et. al., em 2002:

- Qualidade 1: cumulus compacto presente, contendo mais de três camadas de células. Ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração marrom.

- Qualidade 2: cumulus compacto parcialmente presente em volta do oócito ou rodeando completamente o oócito, com menos de três camadas celulares. Ooplasma, com granulações distribuídas heterogeneamente, podendo estar mais concentradas no centro e mais claras na periferia ou condensadas em um só local aparentando uma mancha escura. O ooplasma preenche o espaço do interior da zona pelúcida.

- Qualidade 3: cumulus presente, mas expandido. Ooplasma contraído, com espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida, preenchendo irregularmente o espaço perivitelino, degenerado, vacuolizado ou fragmentado.

- Qualidade 4: oócito desnudo, sem cumulus.

Após a seleção, a maturação dos oócitos é caracterizada por uma série de transformações bioquímicas e estruturais no núcleo e no citoplasma, que são essenciais para o processo de fecundação e subsequente desenvolvimento embrionário (GUEMRA, 2013). A MIV é influenciada por diferentes fatores, como atmosfera gasosa, meio de cultivo, temperatura, suplementação proteica e fatores de crescimento (SANTOS et al., 2002; SUTTON-MCDOWALL et al., 2012; GUEMRA et al., 2013).

Antoniolli (2005) sugere que o meio de maturação tenha características similares à composição do fluido folicular, então, o meio de maturação pode ser constituído de Bicarbonato, suplementado com SFB, FSH, LH, estradiol, piruvato e amicacina, (GOUVEIA, 2011). Após a maturação dos oócitos, deve ser proporcionado um

ambiente adequado, sem risco de contaminação, para que ocorra a capacitação espermática e a fecundação de forma eficaz (GOUVEIA, 2011).

Na fertilização *in vitro*, pode ser utilizado sêmen fresco ou congelado, mas independente do tipo de sêmen, este deve ser submetido aos métodos de capacitação espermática, pois estes procedimentos permitem uma recuperação de espermatozoides de melhor qualidade, mostrando um melhor movimento progressivo e um maior número de células morfológicamente normais (VERTEGEN et al., 2002; GARCIA-ALVAREZ et al., 2010; FRIGONI, 2014; NASCIMENTO, 2014), o que justifica o aumento da utilização dos métodos de seleção nos trabalhos de fertilização *in vitro*.

O processamento do sêmen é uma etapa importante nas tecnologias de reprodução assistida *in vitro* e *in vivo* (BRANDEIS e MANUEL, 1993). Na fertilização *in vitro*, o diluidor deve ser removido da amostra de sêmen a ser utilizada, existindo uma variedade de métodos de separação seletivos e não seletivos. O método de lavagem não seletivo produz um sedimento que contém espermatozoides vivos, mortos e alterados, no entanto, a concentração da amostra é bem superior aos outros métodos. Já os métodos seletivos, tais como o gradiente de densidade de Percoll, o “swim up”, métodos de colunas e outros, selecionam os espermatozoides móveis (BRANDEIS e MANUEL, 1993; QUERO et al., 1997; SRISOMBUT et al., 1998; MORSHEDI et al., 2003 e HALLAP, 2005).

Após a fertilização, o cultivo é uma etapa crucial para a produção. A fim de diminuir os efeitos citotóxicos decorrentes do estresse oxidativo e para um melhor resultado na PIVE, tem sido proposto adicionar antioxidantes nos meios de cultivo oocitário e embrionário (DE MATOS et al., 2002; URDANETA et al., 2004; CROCOMO, 2012), para que atrelado à uma tensão de oxigênio à níveis mais próximos do fisiológico (5%), sejam possibilitados melhores resultados, já que alguns estudos demonstraram que o cultivo *in vitro* sob baixas taxas de oxigênio possibilita uma menor produção de radicais livres (NARS ESFAHANI et al., 1990; LIU Z e FOOT, 1995).

3.3.2 - Cultivo *in vitro* (CIV)

Após o maior entendimento do processo de fecundação, meios capazes de favorecer o crescimento embrionário até o estágio de blastocisto começaram a ser desenvolvidos

(VARAGO, 2008). As pesquisas com utilização de meios definidos e substituição da fonte protéica continuam alvo de interesse desde o início da década de 90 (PINYOPUMMINTR e BAVISTER, 1991; KESKINTEPE e BRACKETT, 1996; VARAGO et al., 2008).

O cultivo *in vitro* vai desde o oócito fertilizado até o estágio de blastocisto (SANGILD et al., 2000; BUENO, 2008), e é durante este período que ocorrem vários eventos, como o processo de divisão celular, compactação dos blastômeros no estágio de mórula e o início da diferenciação embrionária com a formação da blastocèle (HOSHI, 2003; BUENO, 2008).

O cultivo pode se estender até o 7º dia após a fecundação *in vitro*, quando é realizada a seleção e a avaliação dos embriões para transferência ou criopreservação. O cultivo *in vitro* pode se estender até o 8º ou 9º dia após a fecundação, quando para avaliação da taxa de eclosão ou da qualidade embrionária, principalmente pela determinação do número e viabilidade de blastômeros (GONSALVES et al., 2002; MINGOTI, 2005; VARAGO, 2008).

Existe ainda um campo extenso de estudo acerca do desenvolvimento e padronização de meios de cultivo, como, por exemplo, com a utilização de suplementação com fatores de crescimento e antioxidantes, com a finalidade de aperfeiçoar o sistema de cultivo, fazendo com que haja um aumento no desenvolvimento e na qualidade dos embriões produzidos (FRIGONI, 2014).

A utilização de antioxidantes na PIV pode apresentar tanto efeitos positivos, quanto negativos, e isso vai depender de vários fatores, como a concentração destes no meio extracelular, em que momento utilizar, o tempo de cultivo, e a espécie animal em questão, (CHOE, 2010; CROCOMO, 2012). Enquanto na MIV e CIV, a adição de antioxidantes promove efeitos benéficos, supõe-se que no meio de FIV não deve ter a presença do antioxidante, visto que as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) que são produzidas, são fundamentais para hiperativação, capacitação e reação acrossômica dos espermatozoides (STRADAIOLI, 2007; CROCOMO, 2012).

A Glutathiona é um composto conhecido principalmente pelo seu efeito antioxidante, protegendo as células contra os efeitos citotóxicos das EROs, e está diretamente relacionada ao potencial de desenvolvimento ocitário e embrionário, tanto *in vivo* como

in vitro (LUBERDA, 2005; CROCOMO, 2012). O excesso na produção de EROs associada a depleção da concentração intracelular de glutathiona (GSH) são as principais causas da baixa eficiência da PIVE em diversas espécies animais, e isso se deve à deficiências nas condições de cultivo *in vitro* e à ausência do sistema de defesa antioxidante materno (CROCOMO, 2012).

Os antioxidantes são classificados como captadores ou de prevenção, de acordo com seu modo de ação. Os captadores, agem mais rápido com as EROs do que com as células alvo, por isso inibem a oxidação (DAMODARAN et al., 2010; SOUZA, 2016). Entre os importantes captadores presentes nos sistemas biológicos, alguns se destacam, como a Vitamina C, Vitamina E, carnitina e os carotenoides (ARGARWAL et al., 2005; MARTI et al., 2007; SOUZA, 2016).

3.4 – Cantaxantina

A cantaxantina é um carotenoide xantofílico de cor vermelho escuro, que embora seja produzido por bactérias e microalgas e encontrada em fungos, plantas, peixes, aves e crustáceos, também pode ser produzido por síntese química. É um derivado do β -caroteno, usado principalmente pelas indústrias de alimentos e rações, melhorando a coloração da musculatura e na indústria cosmética (GARCIA et al., 2002; BACKER e GÜNTHER, 2004; BREITHAUPT, 2007; PAPP et al., 2013; SOUZA, 2016).

A cantaxantina possui propriedades antioxidantes potentes, pela captura e remoção de radicais livres (RL), e por absorverem e dissiparem o excesso de energia destes, participando também, na preservação da vitamina E (BÖHM et al., 1997; VON SHANT et al., 1999; BEARDSWORTH e HERNANDES, 2003; ROCHA et al., 2011; CARNEIRO, 2013). Esse potencial antioxidante atrelado a uma ação anti-inflamatória, foi comprovado nas células PC2, quando submetidas a estresse oxidativo, reduzindo a formação de EROs (CHAN et al., 2009).

Foi observada uma supressão carcinogênica no cólon de ratos submetidos à dieta com cantaxantina. Houve uma inibição do crescimento de células tumorais, indicando a capacidade deste carotenoide, de induzir apoptose nestas células (TANAKA et al., 1995; PALOZZA et al., 1998; SOUZA, 2016), demonstrando assim, o efeito anticâncer da cantaxantina.

4 - REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S.A.; SAID, T.M. Prevention of Oxidative Stress Injury to Sperm. *Journal of Andrology*, v. 26, n.6, p. 654-660, 2005.
- ANDRADE, E.R.; MELO-STERZA, F.A.; SENEDA M.M.; ALFIERI, A.A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.34, p.79-85, 2010.
- ANTONIOLLI, C.B. Produção *in vitro* de embriões bovinos utilizando diferentes condições de maturação oocitária. Tese de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2005. Disponível em <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/4329>>. Acesso em 14 de julho de 2015.
- ASBIA (Associação Brasileira de Inseminação Artificial). INDEX ASBIA MERCADO, 2014. Disponível em: <www.asbia.org.br> Acesso em 30 de novembro de 2016.
- BAKER, R. and GÜNTHER, C. The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption. *Trends Food Sci Tech.* 15, 484-488; 2004.
- BEARDSWORTH, P. M.; HERNÁNDEZ, J. M. Canthaxanthin is more than a safe carotenoid. *World Poultry, Surrey*, v. 19, p. 14-15, 2003.
- BAYARD, P. et al. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte 1. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, n. 2, p. 212–217, 2007
- BREITHAUPT, D.E. Modern application of xanthophylls in animal feeding - a review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 18, p. 501-506, 2007.
- BÖHM, F.; EDGE, R.; LAND, E.J.; MCGARVEY, D.J.; TRUSCOTT, T.G. *Journal of American Chemical Society*; 119; 621- 622; 1997.
- BRANDEIS, V.T; MANUEL, M.T. Effects of four methods of sperm preparation on the motile concentration, morphology, and acrossome status of recovered sperm from normal semen samples. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* v.10(6), p.409-416, 1993.
- BUENO, A.P.; BELTRAN, M.P. Produção *in vitro* de embriões. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária.* Ano VI, Número 11, Julho de 2008.
- CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; RAMOS, A.A.; VALE FILHO, V.R. Factors influencing *in vitro* embryo production. *Anim Reprod*, v.3, p.19-28, 2006.
- CARNEIRO, J.S.. Pigmentantes de gema: Novo método de avaliação de dor e caracterização da produtividade e saúde das poedeiras. Universidade Federal de Goiás/Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Goiânia, 2013.

- CARVALHO NETO, J. O. Avaliação da qualidade do espermatozóide bovino criopreservado após sexagem por citometria de fluxo e sua utilização na Produção *in vitro* de embriões. Dissertação de Mestrado, Brasília, 2009. Disponível em: <<http://repositorio.unb.br/handle/10482/4712>> Acesso em 14 de julho de 2015.
- CARREIRA, J. T. Avaliação da integridade do acrossoma, membrana citoplasmática, potencial mitocondrial, cromatina e produção de embriões *in vitro* de sêmen bovino com altos índices de gota citoplasmática proximal. Universidade Estadual Paulista / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal - São Paulo - Brasil, 2008.
- CHAVES, R.N.; DUARTE, A.B.G.; MATOS, J.R.; FIGUEIREDO, J.R. Sistemas de cultivo *in vitro* para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.34, n.1, p.37-49, 2010.
- CHOE, C.; SHIN, Y.W.; KIM, E.J.; CHO, S.R.; KIM, H.J.; CHOI, S.H. Synergistic effects of glutathione and β -mercaptoethanol treatment during *in vitro* maturation of porcine oocytes on early embryonic development in a culture system supplemented with L-cysteine. Journal Reprod Dev, 56:575-82; 2010.
- CHAN, K.C.; MONG, M.C.; YIN, M.C. Antioxidative and anti-inflammatory neuroprotective effects of astaxanthin and canthaxanthin in nerve growth factor differentiated PC12 cells. Journal of Food Science, v. 74, n. 7, p. 225-231, 2009.
- CROCOMO, L.F.; MARQUES FILHO, W.C.; ALVARENGA, F.C.L.; BICUDO, S.D. Produção de embriões *in vitro*: estresse oxidativo e antioxidantes. ISSN Impresso 0102-5716. ISSN Eletrônico 2178-3764. 470-490. Veterinária e Zootecnia. Dezembro, 2012.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O. R. Química de Alimentos de Fennema. 4ª ed., Porto Alegre: Editora Artmed, 900p, 2010.
- DE MATOS, D.G.; GASPARRINI, B.; PASQUALINI, S.R.; THOMPSON, J.G. Effect of glutathione stimulation during *in vitro* maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. Theriogenology. 2002;57:1443-51.
- EMBRAPA Gado de Leite/ PanoramaLeite. Ano 6, nº 75, fevereiro/2013. Disponível em:<http://www.cileite.com.br/sites/default/files/2013_02_PanoramaLeite.pdf> Acessado em 19 de novembro de 2016.
- FERREIRA, E.L.; VIREQUE, A.A.; ADONA, P.R. et al. Maturação citoplasmática de oócitos bovinos: aquisição de competência para o desenvolvimento. Rev. Bras. Reprod. Anim., v.32, p.172-181, 2008.
- FAO - Food and Agriculture Organization, 2014 – Bovin. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QA/S>> - Acesso em 19 de novembro de 2016.

- GALLI, C.; LAZZARI, G. Practical aspects 01IVM-IVF in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v.42, p.371-379, 1996.
- GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; RAMÓN, M.; DEL OLMO, E.; MONTORO, V.; DOMINGUEZ-REBOLLEDO, A.E.; BISBAL, A.; JIMÉNEZ-RABADÁM, P.; PÉREZ-GUZMÁN, M.D.; SOLER, A.J. Analysis of selected sperm by density gradient centrifugation might aid in the estimation of *in vivo* fertility of thawed ram spermatozoa. *Theriogenology*, v.74, p.979-988, 2010.
- GARCIA E. A.; MENDES A. A.; PIZZOLANTE C. C.; GONÇALVES H. C.; OLIVEIRA R. P.; SILVA M. A. Efeito dos níveis de cantaxantina na dieta sobre o desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, Campinas, v. 4, n. 1, p. 1-7, 2002.
- GARCIA, J.M., AVELINO, K.B., VANTINI, R. Reprodução Animal Aplicada/ Estudo da arte da Fertilização *in vitro* em Bovinos. *Biotechnology d Reprodução em Bovinos – 1º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada / DMVPRA, FCAV/UNESP – Jaboticabal, 2002*
- 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, p.195-226, 2002.
- GONÇALVES, P. B. D.; BARRETA, M. H.; SANDRI, L. R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. v.31, p.212-217, 2007.
- GOUVEIA, F. F. A produção *in vitro* de embriões bovinos. Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Veterinária. Brasília - DF, 2011.
- GUEMRA, S.; MONZANI, P.S.; SANTOS, E.S.; ZANIN, R.; OHASHI, O.M.; MIRANDA, M.S.; ADONA, P.R. *In vitro* maturation of bovine oocytes in medium supplemented with quercetin, and its effect on embryonic development (Maturação *in vitro* de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetina). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.65, n.6, p.1616-1624, 2013.
- GUERIN P.E.L.; MOUATASSIM, S.; MENEZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum. Reprod. Update*, v.7, p.175-189, 2001.
- HASLER, J.F. Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. v.75, n.10, p.2857-2879, 1992.
- HOSHI, H. *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryo transfer. *Theriogenology*, v.59, p.675-685, 2003.
- HALLAP, T. Assessment of sperm attributes of frozen-thawed AI doses from Swedish and Estonian dairy bulls sires. Tese de doutorado (Divison of comparative

Reproduction, Obstetrics and Udder Health) – Department of Clinical Sciences - Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala. 2005. 34p.

- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home>> Acesso em 19 de novembro de 2016.
- KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B.G. In vitro developmental competence of *in vitro*-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. *Biology of Reproduction*, v.55, p.333-339, 1996.
- KIPPER, B.H. Morfometria e compactação da cromatina espermática de touros Nelore de acordo com a idade e sua influência na Produção de embriões *in vitro*. Universidade Estadual Paulista - UNESP - Jaboticabal, 2014. Ok
- LEIVAS, F. G. Influência da atmosfera gasosa e da fonte proteica sobre o desenvolvimento embrionário *in vitro* e taxa de prenhez em bovinos - Tese de Doutorado - /PPGMV /Santa Maria, RS, Brasil /2006. Acesso em http://coralx.ufsm.br/ppgmv/F.GallasLeivas_Tese_Doutorado.pdf> 30 de junho de 2014.
- LEIBFRIED, L.; FIRST, N.L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *Journal of Animal Science*, v. 48, p. 76-86, 1979.
- LIU, Z.; FOOT, R.H. Development of Bovine Embryos in KSOM with Added Superoxide Dismutase and Taurine and with Five and Twenty Percent O₂. *BIOLOGY OF REPRODUCTION*, 53; 786 -790, 1995.
- LONERGAN, P.; FAIR, T. In vitro-produced bovine embryos — Dealing with the warts. *Theriogenology*, v. 69, p. 17–22, 2008.
- LONERGAN, P.; ADAN, A.G.; PINTADO, B.; FAIR, T.; WARD, F.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M. Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-I growth factor, its receptor, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts produced in vitro. *Molecular reproduction and development*, v. 57, n. 2, p. 146–52, out. 2000.
- LUBERDA, Z. The role of glutathione in mammalian gametes. *Reprod. Biol.* 2005;5:5-17. REVER
- MARTI, E.; MARA, L.; MARTI, J.I.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Seasonal variations in antioxidant enzyme activity in ram seminal plasma. *Theriogenology*, v. 67, p. 1446–1454, 2007.
- MARTINEZ, I.N.; DE SOUZA, L.C. Transferência de embrião e Fertilização *in vitro* (FIV) em bovinos. Universidade Castelo Branco, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Medicina Veterinária. Rio de Janeiro, 2007.

- 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. CD-ROM.
- MORSHEDI, M.; DURAN, H.E.; TAYLOR, S.; OEHNINGER, S. Efficacy and pregnancy outcome of two methods of semen preparation for intrauterine insemination: a prospective randomized study. *Fertility and Sterility*. v.79, p.1625-1632, 2003.
- NASCIMENTO, P.S. Fertilização *in vitro* com sêmen sexado de bovinos da raça 5/8 Girolando. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes, 2014.
- NASR-ESFAHANI, M.H.; AITKEN, Jr, JOHNSON, M.H. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed *in vitro* or *in vivo*. *Development*, 109; 501-501-7;1990.
- NEVES, J. P.; MIRANDA, K. L.; Tortorella, R. D. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. *Revista Brasileira de Zootecnia*; v.39; p.418; Brasília - DF, 2010.
- NOGUEIRA, E.; MINGOTI G.Z.; NICACIO, A.C. Biotécnicas Reprodutivas para aceleração do Melhoramento Genético / Melhoramento Genético Aplicado em Gado de Corte - Capítulo 16: Programa Geneplus-Embrapa. Brasília, DF: Embrapa, 2013. ok
- PALOZZA, P.; MAGGIANO, N.; CALVIELLO, G.; LANZA, P.; PICCIONI, E.; RANELLETTI, F.O.; BARTOLI, G.M. Canthaxanthin induces apoptosis in human cancer cell lines. *Carcinogenesis*, v. 19, n. 2, p. 373–376, 1998
- PAPP, T.; CSERNETICS, Á.; NAGY, G.; BENCSIK, O.; ITURRIAGA, E.A.; ESLAVA, A.P.; VÁGVÖLGYI, C. Canthaxanthin production with modified *Mucor circinelloides* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.97, p. 4937–4950, 2013.
- PENITENTE FILHO, J.M.P.; OLIVEIRA, F.A.; TORRES, C.A.A. Produção de embriões bovinos *in vivo* e *in vitro*. 83ª Semana do Fazendeiro. Universidade Federal de Viçosa / Pró-reitoria de extensão e cultura - Departamento de Zootecnia. Viçosa - MG, 2012.
- PINYOPUMMINTR, T.; BAVISTER, B.D. *In vitro*-matured/*in vitro*-fertilized oocytes can develop into morulae/blastocyst in chemically defined, protein-free culture media. *Biology of Reproduction*, v.45, p.736-742, 1991.
- QUERO, J.M.O.; MILLAN, M.M.; MERLIN, M.P.; MARISCAL, M.A.O.; FRANGANILLO, A.R. Efecto del metodo de seleccion de esperma congelado de bovino sobre los índices de fecundacion y division *in vitro*. *Archivos de Zootécnia*. v.46, p.153-158, 1997.

- RUSSEL, D.F.; BAGIR, S.; BORDIGNON, J.; BETTS, D.H. The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. *Mol Reprod Dev*, v.73, p.1255-1270, 2006.
- ROCHA-FRIGONI, N.A.S.R.; LEÃO, B.C.S.; FELICIANO, M.A.R.; VICENTE, W.R.R.; OLIVEIRA, M.E.F. Produção *in vitro* de embriões ovinos: avanços e desafios. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.38, n.2, p.103-19, 2014.
- ROCHA, J.R.S.; BARBOSA, V.M.; LARA, L.J.C.; BAIÃO, N.C.; POMPEU, M.A.; MIRANDA, D.J.A. Influência da Cantaxantina e da idade sobre a fertilidade de matrizes pesadas. Departamento de Zootecnia, EV/UFMG. Belo Horizonte, MG, Brasil. *Anais do prêmio Lama*, 2011.
- SANGILD, P.T.; SCHMIDT, M.; JACOBSEN, H.; FOWDEN, A.L.; FORHEAD, A.; AVERY, B.; GREVE, T. Blood chemistry, nutrient metabolism, and organ weights in fetal and newborn calves derived from *in vitro* produced bovine embryos. *Biology of Reproduction*, v.62, n.6, p.1495-1504, 2000.
- SANTOS, S.S.D.; DANTAS, J.K.; MIRANDA, M.S. et al. Cinética da maturação nuclear *in vitro* de oócitos bubalinos. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.39, p.266-270, 2002.
- SERAPIÃO, R.V. Desenvolvimento de Embriões Bovinos Produzidos *in vitro* cultivados em meio livre de Soro. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF. Campos do Goytacazes/RJ, 2007.
- SIQUEIRA, K.B., MERCÊS, E.S., PINHO, M.C. Cartilha EMBRAPA Gado de Leite/ Panorama do Leite, Ano 6, nº 75, fevereiro/2013. Disponível em: <http://www.cileite.com.br/sites/default/files/2013_02_PanoramaLeite.pdf> Acesso em 20 de novembro de 2016.
- SOARES, C.A. Estudo do Metabolismo Energético de Embriões Bovinos Produzidos *in vitro* e sua relação com Cinética Embrionária. Universidade Federal do ABC/Centro de Ciências Humanas e Naturais – Santo André, 2014.
- SOUZA, H.M., ARRUDA, L.C.P., MONTEIRO, M.M., NERY, I.H.A.V., SILVA, R.A.J.A., BATISTA, A.M., GUERRA, M.M.P. Efeito da cantaxantina sobre a qualidade do sêmen ovino após a criopreservação. Laboratório de Andrologia (ANDROLAB), Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE. Brasil, 2016.
- SRISOMBUT, C.; MORSHEDI, M.; LIN, M.H.; NASSAR, A.; OEHNINGER, S. Comparison of various methods of processing human cryopreserved-thawed semen samples. *Human Reproduction*. v.13, p. 2151-2157, 1998.
- STRADAIOLI, G.; NOTO, T.; SYLLA, L.; MONACI, M. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. *Theriogenology*. 2007. 67:1249-55.

- SUTTON-McDOWALL, M.L.; FEIL, D.; ROBKER, R.L. et al. Utilization of endogenous fatty acid stores for energy production in bovine preimplantation embryos. *Theriogenology*. v.77, p.1632-41, 2012.
- TANAKA, T.; KAWAMORI, T.; OHNISHI, M.; MAKITA, H.; MORI, H.; SATOH, K.; HARA, A. Suppression of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by dietary administration of naturally occurring xanthophylls astaxanthin and canthaxanthin during the postinitiation phase. *Carcinogenesis*, v. 16, p. 2957–2963, 1995.
- URDANETA, A.; JIMÉNEZ, A.R.; PARAMIO, M.; IZQUIERDO, D. Cysteamine, glutathione and ionomycin treatments improve *in vitro* fertilization of prepubertal goat oocytes. *Zygote*, 2004; 12:277-84.
- USDA – United States Department of Agriculture. Approved by the World Agricultural Outlook Board/USDA November 2013. Disponível em: <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf> - Acessado em 06 de novembro de 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*, Belo Horizonte, v.32, n.2, p.100-109, abr./jun. 2008. Disponível em www.cbra.org.br > Acesso em 22 de janeiro de 2016.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; OCLIN, K. Computer assisted sêmen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57; p.149-179; 2002.
- VON SCHANTZ, T.; BENSCH S.; GRAHN M., HASSELQUIST D.; WITZELL H. Good genes, oxidative stress and condition-dependent sexual signals. *Proceedings of the Royal Society, London*, v. 266, n. 1414, p. 1-12. 1999.

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CANTAXANTINA NO CULTIVO E NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO A PARTIR DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES UTILIZANDO SÊMEN DE TOURO DA RAÇA 5/8 GIROLANDO

Resumo

Na Fertilização *in vitro* (FIV) são produzidos embriões em laboratório, com a finalidade de obter embriões aptos para a transferência. Dentre as etapas da FIV, o cultivo *in vitro* (CIV) é de extrema importância, para que os embriões possam se estabelecer em um meio viável ao seu desenvolvimento. Diante do exposto, o objetivo deste experimento é avaliar o efeito da cantaxantina adicionada ao meio de cultivo na produção *in vitro* de embriões, produzidos a partir do sêmen congelado convencional, de um touro da raça 5/8 Girolando. Para a realização do experimento foram utilizados ovários bovinos colhidos no matadouro imediatamente após o abate, e selecionados os oócitos classificados como qualidade 1 e 2, que seguiram para maturação por 24h. A FIV dos oócitos maturados foi feita com sêmen convencional congelado de touro da raça 5/8 Girolando, indo para incubadora por 18h, antes de serem colocadas para o Cultivo, seguindo a descrição a seguir: Grupo Controle (C) – Sem adição de cantaxantina; Tratamento 1 (T1) – Adição de 1mM de cantaxantina; Tratamento 2 (T2) – Adição de 0,5mM de cantaxantina; Tratamento 3 (T3) – Adição de 0,25mM de cantaxantina. No Dia 3 e 8, após o Dia 0 (dia da FIV), foram avaliadas as taxas de clivagem e taxa de blastocisto, respectivamente. Foram encontradas diferenças significativas nas taxas de blastocistos e na qualidade embrionária.

Palavras-chaves: bovinos; 5/8 girolando; FIV; CIV; cantaxantina;

1. Introdução

Com as melhorias dos índices de produção alcançados nos últimos anos, a pecuária de corte no Brasil vem ganhando destaque no cenário econômico nacional e internacional, tornando-se o segundo maior produtor e maior exportador mundial de carne bovina (IBGE, 2011; USDA, 2016). Esses dados auxiliam no entendimento de que a produção *in vitro* é um assunto de grande importância na produção Nacional e Internacional.

O Brasil lidera a produção e transferência de embriões *in vitro*, respondendo por 68% desse mercado (NOGUEIRA, et. al. 2013), porém, apesar dos avanços obtidos na PIVE, e sua utilização crescente em programas de melhoramento bovino, a quantidade de embriões que atinge o estágio de blastocisto é, raramente, superior a 40% (NEVES et al., 2010; GOUVEIA, 2011), e isso deixa ainda mais evidente a importância de estudos utilizando oócitos recuperados de folículos de vacas abatidas, para que assim, tenhamos uma melhor compreensão dos vários fenômenos e mecanismos biológicos que ocorrem durante todas as etapas da fertilização *in vivo* (GARCIA et al. 2002), auxiliando para o aumento deste percentual.

Como em todas as etapas da PIV, diferentes protocolos têm sido utilizados para o cultivo *in vitro* (GALLI, 1996; BUENO, 2008), e mesmo assim, ainda são obtidos resultados baixos de produção, que podem ser seguramente atribuídos a dois principais fatores: as condições de cultivo *in vitro* (RUSSEL et al., 2006; CHAVES et al., 2010) e a qualidade dos oócitos selecionados para a maturação *in vitro* (CAMARGO et al., 2006; CHAVES et al., 2010).

Visando a necessidade de condições adequadas de cultivo e à diminuição dos fatores prejudiciais na produção, assim como, um aumento na taxa de blastocistos e uma boa qualidade embrionária, tem sido feita a adição de antioxidantes em algumas etapas do processo (SANTOS, 2018). Foram observadas grandes propriedades antioxidantes, assim como, efeito anticâncer e ação anti-inflamatória, na cantaxantina, um carotenoide xantofílico de cor vermelho escuro, que embora seja produzida por bactérias e microalgas, também é produzida por síntese química (SOUZA, 2016).

Este trabalho tem como objetivo avaliar a adição da cantaxantina ao meio de cultivo na produção *in vitro* de embriões, produzidos a partir do sêmen congelado convencional, de touro da raça 5/8 Girolando, analisando a taxa de clivagem, taxa de blastocisto e qualidade embrionária, buscando resultados que possam enfatizar a importância da eficiência nas etapas que envolvem a produção *in vitro* e suas vantagens na Reprodução Animal e no desenvolvimento embrionário.

2 - Metodologia

2.1 - Local do Experimento

Este experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal, na Estação Experimental do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), localizado no Município de Arcoverde, Pernambuco, Latitude 08° 25' 08'' Sul e Longitude 37° 03' 14'' oeste, com uma altitude de 663 metros e índice pluviométrico médio anual de 500 mm, no período de dezembro de 2015 a dezembro de 2016.

2.2 - Colheita dos ovários

No dia inicial do experimento (D -1), os ovários das fêmeas bovinas foram colhidos no matadouro do Município de Arcoverde (Pernambuco), imediatamente após o abate dos animais. Esses ovários foram acondicionados e transportados até o Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal do IPA, em garrafas térmicas contendo solução fisiológica a 0,9% e 40mg de gentamicina, a uma temperatura de 37°C, sem deixar que as estruturas fiquem por muito tempo em temperatura menor que a estabelecida.

2.3 - Aspiração e seleção dos oócitos

No laboratório, os ovários foram lavados com solução salina fosfatada e tamponada (PBS), e colocados no banho maria à 37°C, enquanto eram submetidos à aspiração dos folículos de aproximadamente 2 a 8 mm de diâmetro, com seringa de 10mL e agulha hipodérmica de 40x12 (Figura 1). O líquido folicular aspirado, foi acondicionado em tubo de 50mL, contendo PBS, previamente mantido em banho maria, antes da ida ao matadouro. É esperado cerca de 15 minutos, para que ocorra a decantação do líquido aspirado, podendo assim, observar as estruturas no fundo do tubo (Figura 2). O sobrenadante foi dispensado, e o decantado colocado em uma placa de Petri de 60 mm riscada na parte de baixo, para facilitar a seleção e contagem dos oócitos na lupa. Foi feita a seleção dos oócitos classificados, preferencialmente, como Grau 1 e Grau 2, onde esses, apresentam complexo cúmulus-oócito (COC) compacto, com mais de 3 camadas

de células e citoplasma homogêneo, de acordo com Leibfried e First (1979), adaptado por Gonsalves (2002).

2.4 - Maturação *in vitro* (MIV)

Os oócitos selecionados foram lavados em três gotas sequenciais de 100 μ L de meio de Lavagem, para posteriormente, serem divididos em grupos de 15 a 20 oócitos por gota contendo 100 μ L (cada gota) do meio de Maturação, em placas de petri de 35 mm (Figura 3). Depois da organização dos grupos, foi adicionado o óleo mineral nas placas, para proteção das gotas, e as mesmas seguiram para a estufa (incubadora), com 5% de CO₂ e atmosfera úmida à 38,5°C, durante 24h. Os meios utilizados foram estabilizados nesta mesma estufa, 24 horas antes do início da manipulação.

2.5 - Capacitação Espermática

O sêmen convencional congelado do touro da raça 5/8 Girolando, foi capacitado pelo método gradiente de Percoll. Para tanto, foi utilizado eppendorf de 1,5 mL, adicionando 250 μ L de Percoll a 90% no fundo, acima dessa alíquota, foi adicionado 125 μ L de Percoll a 90% misturado com 125 μ L do meio TL sêmen, e sobre esses, o sêmen descongelado, formando uma separação visível de três cores (Foto 4). Esse eppendorf seguiu para centrífuga padronizada em 9400g/7min. Após esse processo, desprezou-se o sobrenadante e foi adicionado 500 mL do meio FIV, homogeneizando e voltando para a centrífuga com o mesmo padrão de rotação e tempo. Ao finalizar, descartou-se o sobrenadante e foi separado o pellet restante para ser utilizado nas etapas seguintes (Figura 5).

As palhetas dos sêmens foram descongeladas em descongelador eletrônico a 37°C durante 30 segundos.

2.6 - Cálculo da dose inseminante

Para determinar a motilidade espermática, apresentada em porcentagem, foi utilizado 5 μ L do pellet submetido à capacitação, diluído em 95 μ L de meio FIV, num

ependorf de 1,5 mL. Após a homogeneização, foi retirado 5 µL e colocado em uma lâmina coberta com uma lamínula, para determinação da motilidade fazendo a leitura no microscópio, retirando-se do eppendorf, a dose inseminante.

Para determinar a concentração, foi utilizado um eppendorf de 1,5 mL, onde foi adicionado 5 µL do pellet do sêmen capacitado, diluído e homogeneizado em 95 µL de água. Retirou-se 10 µL da mistura e aplicou-se sobre os dois lados da câmara de Neubauer, encaminhando-a para o microscópio, para que fosse feita a contagem das células, nas diagonais de ambos os lados (cinco quadrados de cada lado).

Com a motilidade e concentração analisadas, calculou-se a dose inseminante, com 2×10^6 sptz/mL:

$$[\text{Soma das duas diagonais}] / 10 = Y$$

$$\text{Motilidade (\%)} \times Y = Z$$

$$100 / Z = D \times 2 = \text{Dose inseminante com 2 milhões de espermatozoides}$$

- Para calcular a quantidade do meio complementar da gota de fertilização, segue:

$$100\mu\text{L} - 60\mu\text{L} - 10\mu\text{L} - \text{DOSE INSEMINANTE} = \text{Meio complementar}$$

2.7 - Fertilização *in vitro* (FIV)

Após 24 horas de maturação em estufa (Figura 6), os oócitos foram lavados em três gotas de 100 µL, duas do meio TL sêmen, e uma do meio FIV, respectivamente. Em seguida, os oócitos foram separados em gotas com 50 µL do meio de fecundação (FIV) cada, em uma placa de petri de 35 mm. Todas as gotas receberam a dose inseminante com o sêmen capacitado, e em seguida, cobertas com óleo mineral e completadas com a quantidade de meio FIV que faltar para os 100 µL (gota final: oócitos, espermatozoides e meio). As novas placas foram encaminhadas para a estufa, ficando incubadas por 18 horas.

2.8 - Cultivo *in vitro*

Depois das 18 horas de intervalo, na primeira gota de lavagem com o meio SOF, os oócitos passaram por um desnudamento mecânico parcial, utilizando-se uma pipeta de 50 μ L, onde foram aspirados e liberados, em várias repetições, até ficarem com apenas uma camada de células do cumulus. Depois do desnudamento, os possíveis zigotos foram lavados em mais 2 gotas de 100 μ L do mesmo meio, e posteriormente, colocados em placas com gotas de 100 μ L (total) do SOF, adicionando os tratamentos com a cantaxantina (Figura 7), nos grupos tratados, de acordo com a descrição a seguir: Grupo Controle (C) – Sem adição de cantaxantina; Tratamento 1 (T1) – Adição de 1mM de cantaxantina; Tratamento 2 (T2) – Adição de 0,5mM de cantaxantina; Tratamento 3 (T3) – Adição de 0,25mM de cantaxantina; as gotas prontas foram cobertas com óleo mineral, e colocadas na estufa com os mesmos padrões das etapas anteriores, até a primeira análise, 48h após o cultivo (D3).

Todos os meios utilizados neste trabalho, foram meios comerciais produzidos na Gene Up – Biotecnologia em Reprodução Animal (Presidente Prudente, SP, Brasil).

2.10 – Avaliação do Desenvolvimento e Qualidade Embrionária

Sendo D0 o dia da Fertilização, no terceiro dia (D3) foi feita a avaliação da taxa de clivagem, sendo considerados clivados os embriões que apresentaram duas ou mais células, sem sinal de degeneração celular. No sétimo dia (D7), observou-se a quantidade de blastocistos, e no oitavo dia (D8), foram finalizadas as observações, e fixados os embriões (Figura 8) em paraformaldeído, e armazenando-os refrigerados à 5°C para avaliações posteriores.

Os embriões previamente fixados e armazenados em D8 foram permeabilizados (0.5% v/v TRITON X-100, 0.1% w/v sodium citrate) e corados com corante fluorescente Hoerchst 33342, acrescido do TUNEL (KIT), onde ficaram por 1 hora. Após essa etapa, os embriões foram lavados em PBS, para retirar o excesso do corante e alocados em lâmina e lamínula para visualização em microscopia eletrônica de fluorescência, para avaliação da qualidade embrionária através da contagem do número de células e núcleos apoptóticos dos embriões produzidos.

2.11 - Análises Estatísticas

As taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário, visualizadas nos grupos tratamentos, foram comparadas entre si e com o grupo controle, pelo teste do qui-quadrado. A qualidade embrionária foi avaliada pelo teste ANOVA com nível de significância de 5%, empregando-se o programa estatístico SPSS 20.0.

Para avaliação das imagens, foi utilizado o programa ImageJ. Foram avaliadas 24 imagens, sendo 6 por tratamento. As imagens foram capturadas em lente de aumento de 40x e analisadas com ampliação de 150% para melhor marcação das estruturas e contagem celular. As áreas em pixels foram anotadas para análise de quais células eram túnel positivas/células apoptóticas.

3 – Resultados e discussões

3.1 – Taxa de Clivagem

A avaliação das taxas de clivagem (D3) (Tabela 1) dos grupos controle (C) e tratamentos (T1, T2 e T3) não mostraram diferenças significativas ($p>0,05$) quando comparados entre si.

Tabela 1: comparação das taxas de clivagem dos grupos controle e tratamentos, observadas no terceiro dia de cultivo (D3).

Tratamentos	Clivados/Total	% Clivados
C	78/172	45,34 ^a
T1	96/184	52,17 ^a
T2	85/186	55,14 ^a
T3	82/151	54,30 ^a
Total	341/693	49,20

^a Letra igual na mesma coluna indica que não houve diferença estatística ($p>0,05$) ; $\chi^2 = 4,16$.

Os dados obtidos demonstram que, quantitativamente, a cantaxantina não prejudicou, nem auxiliou em uma melhora considerável, apesar dos grupos tratamentos apresentarem melhor taxa do que o grupo controle. As condições do meio utilizado para o cultivo podem influenciar na cinética de desenvolvimento inicial, mas a falta de macromoléculas oriundas do próprio folículo, que são necessárias à embriogênese inicial e alguns fatores que controlam esses parâmetros, podem ser intrínsecos ao oócito e/ou aos espermatozoides (DE SOUSA et al., 1998; WATSON et al., 2000; NATALE et al., 2001; NIEMANN e WRENZYCKI, 2003; SERAPIÃO, 2007). As células do cúmulus presente no oócito produzem sinais que são essenciais ao crescimento e maturação oocitária e quando essas células são manipuladas fora do ambiente fisiológico, perdem parte de sua eficiência, como a de remoção de componentes que podem estar diminuindo e comprometendo a competência de desenvolvimento, o que também pode justificar o baixo número de clivagens (TANGHE et al., 2002; HAFEZ e HAFEZ, 2003; SALHAB et. al., 2013; HAMMOND et. al., 2016; MAREI et al., 2016).

3.2 – Taxa de Blastocistos

A avaliação das taxas de blastocistos de todos os grupos estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: comparação das taxas de blastocistos produzidos no oitavo dia de cultivo (D8).

Tratamentos	D8 – Blastocistos produzidos/Total Clivados	% Blastocistos
C	57/78	73,07 ^a
T1	47/96	48,95 ^b
T2	60/85	70,58 ^a
T3	44/82	53,65 ^b
Total	208/341	60,99

^a Letra igual na mesma coluna indica que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) ; $\chi^2 = 3,05$.

Podemos observar que o grupo controle mostra melhor resultado, comparado aos grupos tratamentos 1 e 3. Porém, o grupo T2 teve um melhor resultado comparado aos demais tratamentos, isso sugere que a quantidade do antioxidante utilizado deve ser levada em consideração, visto que, a quantidade de 0,5mM foi ideal, e as demais quantidades não influenciaram positivamente. É atribuído à cantaxantina um grande efeito antioxidante, pela potente capacidade de capturar radicais livres e pela preservação da vitamina E (VON SCHANT et. al., 1999; BEARDSWORTH e HERNANDES, 2003; CARNEIRO, 2013). Santos (2018) relatou que o enriquecimento do meio de cultivo com a crocetina, que também é um carotenoide antioxidante, melhorou a produção e qualidade dos blastocistos, protegendo melhor os embriões do estresse oxidativo, diminuindo os níveis de EROs. Também foi observado um desenvolvimento mais rápido dos blastocistos, bem como estruturas de qualidade superior aos demais (Grau 1 e 2), como também foi relatado por Zullo (2016), ao adicionar a crocetina ao meio de cultivo. É interessante salientar também que, embriões com cinética de desenvolvimento mais rápida, sobrevivem melhor à criopreservação (NEDAMBALE, 2004), assim, os resultados obtidos neste trabalho, demonstram que o uso da cantaxantina no meio de cultivo, é uma boa alternativa para a produção, revertendo os efeitos do estresse oxidativo, melhorando consideravelmente a qualidade embrionária e assegurando um melhor uso das estruturas produzidas e sua criotolerância, como comprovaram Takahashi (2012), Salzano (2014) e Zullo (2016).

3.3 – Avaliação Túnel

Foi feita a contagem celular dos 24 embriões selecionados, para avaliação das células túnel positivo (CP) e túnel negativo (CN) de todos os grupos, Tabela 3.

Tabela 3: comparação das taxas de células túnel positivo e túnel negativo e suas respectivas percentagens.

Tratamentos	CN	CP	%CN	%CP
C	53,33 ± 35,53	2,33 ± 2,25 ^a	94,64	5,36
T1	43,16 ± 19,30	0,66 ± 1,21 ^a	97,75	2,25
T2	56,16 ± 20,21	0,00 ± 0,00 ^b	100	0
T3	34,00 ± 8,31	0,00 ± 0,00 ^b	100	0
	p = 0,27	p = 0,01		

^a Letra igual na mesma coluna indica que não houve diferença estatística (p<0,01)

Sendo evidente que o estresse oxidativo é um dos principais fatores para as baixas taxas na produção *in vitro* de embriões e estruturas com qualidade baixa, o presente estudo mostra que a adição da cantaxantina no meio de cultivo, melhorou a produção *in vitro* de embriões, apresentando estruturas com maior número de blatômeros, podendo ser classificadas em sua maioria, como grau 1 e 2. Nos tratamentos 2 e 3, podemos observar a ausência de células túnel positivas, indicando a não existência de núcleos apoptóticos. Zullo (2016) também obteve resultados positivos acerca do desenvolvimento e da qualidade dos blastocistos produzidos, mostrando um efeito anti-apoptótico após o enriquecimento do meio de cultivo com a crocetina.

4 – Conclusões

De acordo com o trabalho executado e os dados encontrados, foi observado que o uso da cantaxantina na quantidade ideal, foi eficaz, promovendo benefícios na produção, como o efeito anti-apoptótico. Sendo assim, é interessante que sejam feitas avaliações do perfil bioquímico, bem como, a criopreservação e transferência dos embriões produzidos sob o efeito da cantaxantina, para que sejam elucidadas maiores vantagens, e os embriões sejam avaliados no meio intra-uterino e pós-transferência.

5 – Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), assim como, ao Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA), pelo apoio financeiro para grande parte deste estudo.

6 – Referências Bibliográficas

- BAYARD, P. et al. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte 1. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 31, n. 2, p. 212–217, 2007.
- BLODIN, P.; BEAULIEU, M.; FOUMIER, V.; MORIN, N.; CRAWFORD, L.; MADAN, P.; KING, W.A. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. Theriogenology; 71: 30-38; 2009.
- BUENO, A.P.; BELTRAN, M.P. Produção *in vitro* de embriões. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária. Ano VI, Número 11, Julho de 2008.
- CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; RAMOS, A.A.; VALE FILHO, V.R. Factors influencing *in vitro* embryo production. Anim Reprod, v.3, p.19-28, 2006.
- CARNEIRO, J.S; Pigmentantes de Gema: novo método de avaliação de cor e caracterização da produtividade e saúde das poedeiras; Universidade Federal de Goiás; Goiânia, 2013.
- CHAVES, R.N.; DUARTE, A.B.G.; MATOS, J.R.; FIGUEIREDO, J.R. Sistemas de cultivo *in vitro* para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.34, n.1, p.37-49, 2010.
- DE SOUSA, P. A.; WESTHUSIN, M. E.; WATSON, A. J. Analysis of variation in relative mRNA abundance for specific gene transcripts in single bovine oocytes and early embryos. Molecular Reproduction and Development, v.49, p.119 - 130, 1998.
- GARCIA, J.M., AVELINO, K.B., VANTINI, R. Reprodução Animal Aplicada/ Estudo da arte da Fertilização *in vitro* em Bovinos. Biotecnologia d Reprodução em Bovinos – 1º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada / DMVPRA, FCAV/UNESP – Jaboticabal, 2002.
- GALLI, C.; LAZZARI, G. Practical aspects 01IVM-IVF in cattle. Anim. Reprod. Sei., v.42, p.371-379, 1996.
- GOUVEIA, F. F. A produção *in vitro* de embriões bovinos. Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Veterinária. Brasília - DF, 2011.

- HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Reprodução Animal; Sétima Edição, 2003.
- HAMMOND, E.R.; GREEN, M.P.; SHELLING, A.N.; BERG, M.C.; PEEK, J.C.; CREE, L.M. Oocyte mitochondrial deletions and heteroplasmy in a bovine model of ageing and ovarian stimulation. *Mol Hum Reprod*; 22(4):261-71; 2016.
- LONERGAN, P.; FAIR, T. In vitro-produced bovine embryos — Dealing with the warts. *Theriogenology*, v. 69, p. 17–22, 2008.
- LONERGAN, P.; ADAN, A.G.; PINTADO, B.; FAIR, T.; WARD, F.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M. Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-I growth factor, its receptor, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts produced in vitro. *Molecular reproduction and development*, v. 57, n. 2, p. 146–52, out. 2000.
- MAREI, W.F.; RAHEEM, K.A.; SALAVATI, M.; TREMAINE, T.; KHALID, M.; FOULADI-NASHTA, A.A.; Hyaluronan and hyaluronidase, which is better for embryo development?. *Theriogenology*; 1;86(4):940-8; 2016.
- MARQUES, C.C.; BAPTISTA, M.C.; PEREIRA, R.M.; VASQUES, M.I.; LOPES da L.F. C.; HORTA, A.E.M. Influência do sêmen de diferentes touros sobre as taxas de fertilização in vitro e desenvolvimento de embriões em co-cultura. *Revista Portuguesa de Zootecnia*. 2(2): 103-110; 1995.
- NASCIMENTO, P.S. Fertilização in vitro com sêmen sexado de Bovinos da Raça 5/8 Girolando. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação; Garanhuns, 2014.
- NATALE, D.R.; DE SOUSA, P.A.; WESTHUSIN, M.E.; WATSON, A.J. Sensitivity of bovine blastocyst gene expression patterns to culture environment assessed by differential display RT-PCR. *Reproduction*, v. 122, p.687- 693, 2001.
- NEDAMBALE, T.L.; DINNYÉS, A.; YANG, X.; TIAN, X.C. Bovine blastocyst development in vitro: timing, sex, and viability following vitrification. *Biol Reprod* 2004;71:1671–6.
- NEVES, J. P.; MIRANDA, K. L.; Tortorella, R. D. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. *Revista Brasileira de Zootecnia*; v.39; p.418; Brasília - DF, 2010.
- NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. Epigenetic reprogramming in early embryonic development: effects of in-vitro production and somatic nuclear transfer. *Reproductive Bio Medicine Online*, v.7, n. 6, p.649-56, 2003.
- NOGUEIRA, E.; MINGOTI G.Z.; NICACIO, A.C. Biotécnicas Reprodutivas para aceleração do Melhoramento Genético / Melhoramento Genético Aplicado em Gado de Corte - Capítulo 16: Programa Geneplus-Embrapa. Brasília, DF: Embrapa, 2013.

- RUSSEL, D.F.; BAGIR, S.; BORDIGNON, J.; BETTS, D.H. The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. *Mol Reprod Dev*, v.73, p.1255-1270, 2006.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal Reproduction Science*, v.38, p.1-36, 1995.
- SALHAB, M.; DHORNE-POLLET, S.; AUCLAIR, S.; GUYADER-JOLY, C.; BRISARD, D.; DALBIES-TRAN, R.; DUPONT, J.; PONSART, C.; MERMILLOD, P.; UZBEKOVA, S. In vitro maturation of oocytes alters gene expression and signaling pathways in bovine cumulus cells. *Mol Reprod Dev*; 80(2):166-82; 2013.
- SALZANO, A.; ALBERO, G.; ZULLO, G.; NEGLIA, G.; ABDEL-WAHABB, A.; BIFULCO, G.; et al. Effect of resveratrol supplementation during culture on the quality and cryotolerance of bovine in vitro produced embryos. *Anim Reprod Sci* 2014;151:91–6.
- SANTOS, E.C.; VARCHETTA, R.; LIMA, C.B.; ISPADA, J.; MARTINHO, H.S.; FONTES, P.K.; NOGUEIRA, M.F.G.; GASPARRINI, B.; MILAZZOTTO, M.P. The effects of crocetin supplementation on the blastocyst outcome, transcriptomic and metabolic profile of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology*, 2018.
- SERAPIÃO, R.V. Desenvolvimento de Embriões Bovinos Produzidos in vitro cultivados em meio livre de Soro. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF. Campos do Goytacazes/RJ, 2007.
- SOARES, C.A. Estudo do Metabolismo Energético de Embriões Bovinos Produzidos in vitro e sua relação com Cinética Embrionária. Universidade Federal do ABC/Centro de Ciências Humanas e Naturais – Santo André, 2014.
- SOUZA, H.M.; ARRUDA, L.C.P.; MONTEIRO, M.M.; NERY, I.H.A.V.; SILVA, R.A.J.A.; BATISTA, A.M.; GUERRA, M.M.P. Efeito da cantaxantina sobre a qualidade do sêmen ovino após a criopreservação. Laboratório de Andrologia (ANDROLAB), Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE. Brasil, 2016.
- TAKAHASHI, M. Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of mammalian embryos. *J Reprod Dev* 2012;58:1–9.
- TANGUE, S.; VAN SOOM, A.; NAUWYNCK, H.; CORYN, M.; DE KRUIF, A. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol Reprod Dev*. Mar;61(3):414-24. 2002.
- ZULLO, G.; ALBERO, G.; NEGLIA, G.; De CANDITIIS, C.; BIFULCO, G.; CAMPANILE, G.; et al. L-Ergothioneine supplementation during culture improves quality of bovine in vitro produced embryos. *Theriogenology* 2016; 85:688–97.

- ZULLO, C.; De CANDITIIS, M.E; PERO, G.; ALBERO, G.; SALZANO, A.; NEGLIA, G.; CAMPANILE, G.; GASPARRINI, B. Crocetin improves the quality of in vitro-produced bovine embryos: Implications for blastocyst development, cryotolerance, and apoptosis. *Theriogenology*, 2016.

6 – Considerações Finais

Na busca por embriões de qualidade superior, faz-se necessário avaliações mais profundas dos blastocistos produzidos, e da ação da cantaxantina a nível celular, como a atividade mitocondrial, e pós-transferência, para que se obtenha uma comparação definida e esclarecedora da qualidade embrionária dos Grupos avaliados e da atuação eficiente da cantaxantina, encontrada neste trabalho.

7 – Apêndices

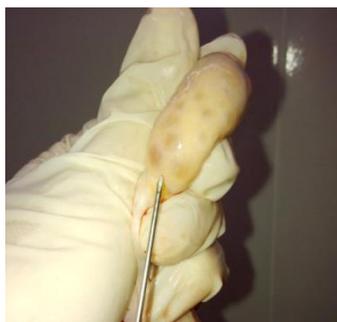


Figura 1 – Folículos sendo aspirados (Fonte pessoal)



Figura 2 – Líquido folicular aspirado (Fonte pessoal)

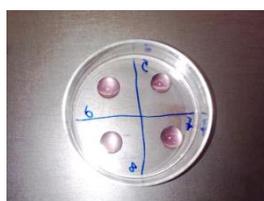


Figura 3 – Organização das gotas com as estruturas (Fonte pessoal)



Figura 4 – Gradiente de Percoll



Figura 5 – Espermatozoides capacitados ao fundo do eppendorf (Fonte pessoal)



Figura 6 – oócitos maturados (Fonte pessoal)



Figura 7 – cantaxantina (Fonte pessoal)



Figura 8 – Alguns embriões produzidos (Fonte pessoal)



Figura 9 – Embriões de grau 1, 2 (Fonte pessoal)

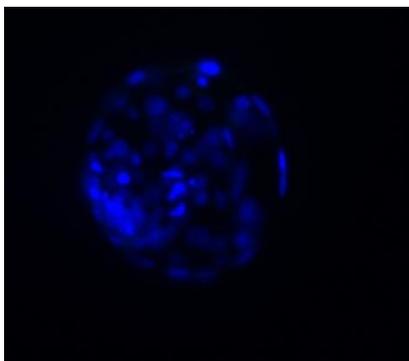


Figura 10 – Embrião visto em microscopia eletrônica de fluorescência (Fonte pessoal)

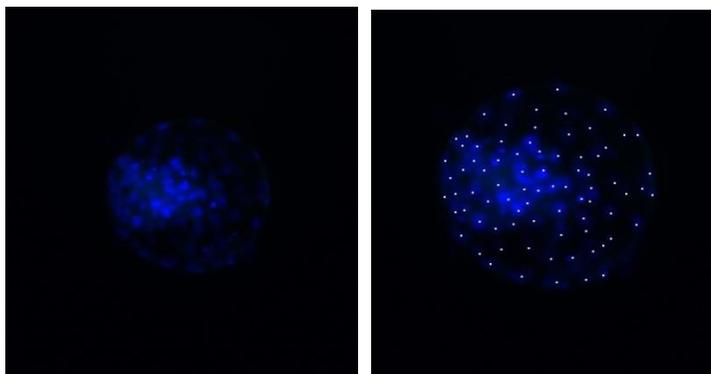


Figura 11 – Embrião submetido à avaliação pelo programa imageJ para marcação e contagem celular (Fonte Pessoal)

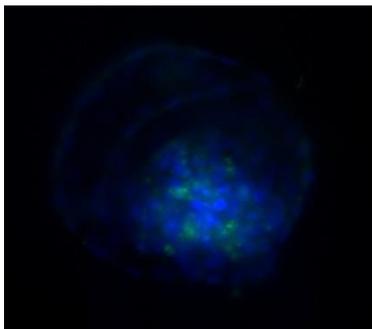


Figura 12 – Embrião visto em microscopia eletrônica de fluorescência, apresentando túnel positivo (Fonte Pessoal)