



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

MONOGRAFIA

Impacto do estresse oxidativo na maturação de oócitos *in vitro*: Efeito antioxidante do tanino

Millena Mary da Silva Ramires

Recife – PE

2023



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

MONOGRAFIA

Impacto do estresse oxidativo na maturação de oócitos *in vitro*: Efeito antioxidante do tanino

Millena Mary da Silva Ramires

Graduanda

Orientador: Prof^a. Dr^a. Andreia Fernandes de Souza

Co-orientador: Prof. Dr. André Mariano Batista

Recife - PE

2023



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

MILLENA MARY DA SILVA RAMIRES
Graduanda

Monografia submetida ao Curso de Zootecnia como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Zootecnia.

Aprovado em: 05/09/2023

EXAMINADORES:

Prof^a. Dr^a. Andreia Fernandes de Souza

Prof^o. Dr^o. Cláudio Coutinho Bartolomeu (DMV-UFRPE)

Dr^o. Rafael Artur da Silva Júnior

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R173i Ramires, Millena Mary da Silva
Impacto do estresse oxidativo na maturação de oócitos in vitro: Efeito antioxidante do tanino / Millena Mary da Silva
Ramires. - 2023.
49 f. : il.

Orientadora: Andreia Fernandes de Souza.
Coorientador: Andre Mariano Batista.
Inclui referências.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em Zootecnia, Recife, 2023.

1. Produção in vitro. 2. Espécies reativas de oxigênio. 3. Bovinos. 4. Oócitos. 5. Tanino. I. Souza, Andreia Fernandes de, orient. II. Batista, Andre Mariano, coorient. III. Título

CDD 636

“Você nunca sabe que resultados virão da sua ação.
Mas se você não fizer nada, não existirão resultados.”
(Mahatma Gandhi)

A minha família, meu alicerce de todas as horas.
E aos amigos que de alguma forma fizeram parte de tudo isso.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo agradeço a Deus por me acompanhar dando discernimento, garra e determinação durante toda essa jornada. E por me proporcionar viver tantas coisas que eu nunca imaginei há 5 anos atrás.

À minha família, especialmente meus pais: Marinaldo Ramires e Juliana Ramires, por todo suporte, paciência nos dias difíceis e dedicação para me proporcionar o melhor possível. Vocês são fundamentais diariamente, eu não teria conquistado nada e nem seria 1% do que eu sou hoje sem vocês. Desde sempre fizeram (e continuam fazendo) o maior dos esforços para todo o meu desenvolvimento, sou extremamente grata pela benção de ser sua filha.

Também a minha queridíssima irmã Emilly Ramires, a melhor amiga que Deus poderia ter me dado. Você não tem ideia do quanto é fundamental nos meus dias, das pequenas as grandes coisas que fazemos juntas. Amo nossas conversas sobre os mais diversos assuntos e nossas maratonas de doramas. Você é a minha companhia preferida.

Meus pais, minha irmã, eu amo vocês do tamanho do mundo e muito mais!

Aos meus melhores amigos: Monique Siqueira, Rebeca Oliveira, Matheus Muniz e Larissa Santos, meus companheiros de graduação e da vida. Durante todos esses anos de graduação eu certamente não teria escolhido pessoas melhores para estarem comigo. Obrigada por serem a melhor equipe de suporte, conselhos e aventuras durante todos esses anos. Eu aprendo e evoluo tanto com nossas reflexões, dou as melhores risadas, espaiço e sei que certamente tenho com quem contar nas horas boas e difíceis.

A todos os grupos e setores que me acolheram e proporcionaram tanto aprendizado. Especialmente aos grupos: Grupo de Estudos em Reprodução e Produção Animal – GERPA e Laboratório de Biotécnicas Aplicadas à Reprodução – LBR, nesses dois ambientes eu pude aprender o que realmente é trabalho em equipe e como é gostoso e satisfatório fazer o que se gosta. Também conheci as melhores pessoas que são ótimas companhias de rotinas, manejo e bons momentos construtivos de diálogo (fofocas). Em especial: Raquel Desenzi, Rafael Júnior, Camila Medeiros e Maria Luisa. Vocês me cativaram tanto, tenho um carinho imenso por vocês.

Através do GERPA, na pandemia, eu pude fazer a melhor das conexões com 4 pessoas incríveis: Adeildo Neto, Davi Tavares e os professores Dr^o João Paulo Ismério dos Santos Monnerat e Dr^a Andreia Fernandes de Souza. Trabalhar com vocês é sempre uma delícia, um misto de aprendizado com descontração e boas músicas. Vocês me fazem um bem danado, sou muito grata por vocês em minha vida. Obrigada por tanto!

Também a todos os professores que agregaram em minha formação ao longo dessa caminhada com o brilho no olhar e a garra para fazer a diferença no ensino dentro da universidade pública. Vocês são grandes exemplos!

A meus orientadores, Dr^a Andreia Fernandes de Souza e Dr^o André Mariano Batista, pela paciência, suporte, por me acolherem tão bem e ensinar tanto, vocês certamente fazem toda a diferença para a minha formação. Ambos, para mim, são grandes exemplos do que é ser um profissional exemplar e apaixonado pelo o que faz. Vocês me inspiram muito!

A todos os funcionários que fazem da Universidade Federal Rural de Pernambuco, que sempre foi minha segunda casa, um ambiente tão acolhedor. E especialmente, com todo carinho, a Dona Silvana, Seu Edson e Rafaela que são sempre muito atenciosos, fazendo tudo com muito amor, humildade e me ensinam tanto.

Enfim, para todos que contribuíram direta e indiretamente de alguma forma nessa minha jornada.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	14
2.1 Geral.....	14
2.2 Específicos.....	14
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1 Produção <i>in vivo</i> de embriões bovino	15
3.2 Produção <i>in vitro</i> de embriões bovino	16
3.3 Maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovino	17
3.4 Fertilização <i>in vitro</i> de oócitos bovino	21
3.5 Cultivo <i>in vitro</i> de embriões bovinos	22
3.6 Características dos embriões produzidos <i>in vitro</i>	23
3.7 Fatores que interferem na produção de embriões <i>in vitro</i>	23
3.8 Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) e Estresse Oxidativo (EO)	25
3.9 Antioxidantes e sua atuação.....	26
3.10 Tanino (TA) e seu mecanismo de ação	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Desenho experimental.....	29
4.2 Coleta de oócitos e maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	29
4.3 Avaliação do estágio meiótico	31
4.4 Preparação espermática e fertilização <i>in vitro</i> (FIV).....	33
4.5 Cultivo embrionário (CIV)	34
4.6 Análises estatísticas.....	35
4.7 Etapa pré experimental	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
7 BIBLIOGRAFIA.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Oócitos após 24 horas de maturação com a expansão das células do complexo <i>cumulus oophorus</i> (COC) sinalizando a maturação.....	17
Figura 2. Etapas da maturação nuclear oocitária.....	18
Figura 3. Oócito em metáfase II com extrusão do primeiro corpúsculo polar (P).....	20
Figura 4. Oócito fertilizado com presença de dois pró-núcleos (PN) e dois corpúsculos polares (P).....	22
Figura 5. Aspiração dos folículos antrais e recuperação oocitária.....	30
Figura 6. Esquema referente ao processo de maturação <i>in vitro</i>	31
Figura 7. Processo para confecção de lâminas para avaliação do estado meiótico.....	32
Figura 8. Oócitos corados com Hoechst 33342 para serem avaliados sob microscopia de fluorescência. Podendo ser observados oócitos em vesícula germinativa (GV, A), quebra da vesícula germinativa (GVBD, B), metáfase I (MI, C), e metáfase II (MII, D).....	33
Figura 9. Processo de capacitação para inseminação dos oócitos maturados.....	34
Figura 10. Cultivo celular e observação referente as taxas de clivagem, seta verde sinalizando células que apresentaram clivagem no segundo dia após fertilização.....	35
Figura 11. A. Oócitos maturados e selecionados para confecção das lâminas; B. Oócitos sem as células do <i>cumulus</i> , desnudas para realização do cultivo (CIV).....	36
Figura 12. Avaliação da expansão das células do <i>cumulus oophorus</i> após 24 horas de maturação <i>in vitro</i> : (A, E) Grupo controle; (B, F) 1 µg/mL TA, (C,G) 10 µg/mL TA; (D,H) 100 µg/mL TA.....	37
Figura 13. Oócito em metáfase 2 (a esquerda) corado com Hoeschst 33342 e com extrusão do primeiro corpúsculo polar (a direita).....	38
Figura 14. Observação de blastocistos ao sétimo dia após a fertilização <i>in vitro</i> : (A) Grupo controle; (B) 1 µg/mL TA, (C) 10 µg/mL TA; (D) 100 µg/mL TA.....	39

RESUMO

As condições *in vitro* podem acabar promovendo danos aos oócitos devido ao estresse oxidativo, comprometendo sua qualidade e taxas de sucesso na produção de embriões. Pesquisas têm reportado que suplementar o meio de maturação *in vitro* com diferentes antioxidantes ajudaram a mitigar os danos provenientes do estresse oxidativo. Assim, o tanino que possui ação antioxidante desperta o interesse para estudos acerca de seus potenciais antioxidantes na maturação oocitária. A fim de promover maiores conhecimentos científicos, sobre a ação do tanino na maturação de oócitos, levou-se a realização deste estudo. Foram utilizados ovários de vacas adultas obtidos em abatedouro comercial, destes folículos antrais foram aspirados para a seleção de oócitos com citoplasma homogêneo e uma ou mais camadas compactas de células do *cumulus*. Após a maturação, estas células foram removidas através de pipetagens para posterior confecção das lâminas e leitura referente ao estágio meiótico celular. Os grupos experimentais utilizados consistem em diferentes concentrações de Tanino (Sigma), sendo: TA0 = sem adição de Tanino (controle); TA1 = 1 µg/mL de Tanino; TA10 = 10 µg/mL de Tanino e TA100 = 100 µg/mL de Tanino. Com a experimentação puderam ser obtidas taxas de maturação similares para todos os tratamentos testados: TA0 (79,31%) TA1 (72,63%) TA10 (80,95%) TA100 (73,11%). Já referente as taxas de clivagem obtidas após fertilização dos, foi observado que os tratamentos TA0 (73,13%) TA1 (63,38%) TA10 (70,90%) apresentaram resultados semelhantes, enquanto, o tratamento T100 (47,91%) apresentou efeito deletério com uma diminuição significativa nas taxas de clivagem. Dessa forma, recomenda-se que a suplementação do tanino seja realizada em quantidades inferiores a 100 µg/mL.

ABSTRACT

In vitro conditions can end up promoting damage to oocytes due to oxidative stress, compromising their quality and success rates in embryo production. Research has reported that supplementing the *in vitro* maturation medium with different antioxidants helped mitigate damage from oxidative stress. Thus, tannin, which has antioxidant action, arouses interest in studies on its antioxidant potential in oocyte maturation. This study was carried out to promote greater scientific knowledge about the action of tannin on oocyte maturation. Ovaries from adult cows obtained from a commercial slaughterhouse were used. These antral follicles were aspirated to select oocytes with homogeneous cytoplasm and one or more compact layers of cumulus cells. After maturation, these cells were removed by pipetting for subsequent preparation of slides and reading regarding the cellular meiotic stage. The experimental groups consist of different concentrations of Tannin (Sigma), being: TA0 = no addition of Tannin (control); TA1 = 1 µg/mL Tannin; TA10 = 10 µg/mL of Tannin and TA100 = 100 µg/mL of Tannin. With the experiment, similar maturation rates were obtained for all treatments tested: TA0 (79.31%) TA1 (72.63%) TA10 (80.95%) TA100 (73.11%). Regarding the cleavage rates obtained after fertilization, it was observed that treatments TA0 (73.13%) TA1 (63.38%) TA10 (70.90%) presented similar results, while treatment T100 (47.91 %) showed a deleterious effect with a significant decrease in cleavage rates. Therefore, it is recommended that tannin supplementation be carried out in amounts below 100 µg/mL.

1 INTRODUÇÃO

De acordo com os dados mais recentes do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, no Brasil, no ano de 2021, o rebanho bovino apresentou um quantitativo aproximado de 224,6 milhões de cabeças. Este quantitativo, em sua grande parte, é devido a alta demanda em produção de alimentos atrelado ao crescimento populacional. Por isso, há necessidade na otimização nos custos de produção o que promove cada vez mais espaço para as biotecnologias da reprodução que agregam melhoramento genético ao sistema produtivo

Nesse aspecto a produção de embriões *in vitro* (PIVE) surge proporcionando, a partir de um número reduzido de fêmeas com alto potencial genético, o aumento da eficiência reprodutiva e velocidade no ganho genético dos animais.

Para isso, é importante que a completa maturação oocitária ocorra para que estas células se encontrem aptas para serem fecundadas, esta maturação é proveniente de mudanças simultâneas que ocorrem no núcleo e citoplasma (Trindade et al., 2016). No entanto, as condições *in vitro* podem acabar promovendo danos aos oócitos devido ao estresse oxidativo (EO), o que consequentemente compromete sua qualidade e taxas de sucesso na produção de embriões. Dessa forma, pesquisas têm reportado que suplementar o meio de maturação *in vitro* (MIV) com diferentes antioxidantes ajudaram a mitigar os danos provenientes do estresse oxidativo em que eles são submetidos, e na melhoria da competência de desenvolvimento do oócito na PIVE (Andrade *et al.*, 2010, Budani e Tiboni, 2020).

Assim, o tanino (TA), que dentre suas diversas funcionalidades possui ação antioxidante, é um composto presente nas fontes de volumosos e concentrados para os animais ruminantes. E assim, desperta o interesse quanto a uma maior elucidação acerca de seus potenciais antioxidantes no processo de maturação oocitária. Isto pode ser um diferencial tanto no meio *in vitro*, como na relação entre a alimentação e aspectos reprodutivos das vacas. Por isso, visto a necessidade de mais estudos sobre a ação do TA na maturação de oócitos, levou-se a realização deste estudo a fim de promover maiores conhecimentos científicos e entender melhor as suas funcionalidades.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar os efeitos da suplementação com Tanino (TA) no meio de maturação *in vitro* (MIV).

2.2 Específicos

Observar se há influência do Tanino e suas propriedades antioxidantes em oócitos de vacas, durante o processo de maturação e fertilização *in vitro*, através da observação referente à maturação nuclear por meio da observação quanto ao estado meiótico celular e taxas de clivagens.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Produção *in vivo* de embriões bovino

Desde o início da utilização da inseminação artificial como aliada à reprodução animal, nos anos 1970, que os avanços biotecnológicos dentro da reprodução animal não cessaram, agregando em facilidade nos manejos, impactos econômicos, tanto referentes a lucros quanto a despesas, dentro dos sistemas de produção (Gonçalves, 2008).

A produção *in vivo* de embriões, que também pode ser denominada como múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE), abrange: a indução de estro das fêmeas que serão doadoras, superovulação, fecundação dos oócitos seja por inseminação ou monta natural, a coleta dos embriões a partir da lavagem realizada no útero, seguida pela transferência destes para o útero de fêmeas receptoras sincronizadas. Há também a possibilidade em ser realizada a criopreservação dos embriões, assim, são armazenados para ser transferidos em outro momento como também, para estudos científicos (Fonseca *et al.*, 2014).

Há mais de 40 anos, a produção de embriões *in vivo* tem sido implementada como técnica aliada à reprodução de fêmeas bovinas. No entanto, a variabilidade quanto à resposta do protocolo da superovulação e para a produção de embriões, também os custos atrelados aos protocolos hormonais se apresentam como alguns fatores limitantes. Em virtude as vacas serem monovulatória, há necessidade do emprego de gonadotrofinas, principalmente o hormônio folículo estimulante (FSH) para promover o desenvolvimento de múltiplos folículos para ovulação. Também havendo influência da idade, estação do ano, genética da fêmea, aspectos nutricionais e sanidade que podem interferir na resposta da indução da ovulação (Mikkola *et al.* 2019).

Os protocolos para a MOTE são uma ferramenta importante que promove condições para que as fêmeas produzam um quantitativo de prole superior ao que seria possível no método natural durante sua vida produtiva. Com essas tecnologias, há possibilidade na realização de práticas para conservação de raças ameaçadas de extinção, importação e exportação de germoplasma (Cognié *et al.*, 2003; Fonseca *et al.*, 2014; Pinto *et al.*, 2017).

Assim, a introdução dessa técnica promoveu condições que agora são indispensáveis à reprodução animal, e, desse modo possibilitou o desenvolvimento das demais técnicas da biotecnologia, como por exemplo, a da produção e fertilização *in vitro* (Figueiredo *et al.*, 2007).

3.2 Produção *in vitro* de embriões bovino

O objetivo da produção *in vitro* de embriões (PIVE) é a produção de embriões que sejam viáveis a partir do uso de vacas saudáveis e com alta genética, ou que possam estar impossibilitadas em reproduzir por técnicas convencionais. Para o emprego da técnica, podem ser utilizadas como doadoras de oócitos, fêmeas a partir dos seis meses, fêmeas penhas ou mesmo no pós-parto (Bueno e Beltran, 2008).

Segundo dados aferidos no ano de 2019 pela Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões – SBTE, o Brasil, ocupando a nível mundial, a 2ª colocação referente à produção de embriões bovinos (Viana, 2021).

Segundo Souza (2020), a produção *in vitro* de embriões (PIVE) é um artifício bastante utilizado na bovinocultura com finalidades científicas e comerciais. No entanto, para a utilização desta ferramenta, é fundamental que seja implementado um manejo reprodutivo adequado, para em seguida se proceder todas as etapas até a transferência dos embriões (Oliveira, Serapião e Quintão, 2014).

Algumas técnicas podem ser utilizadas para a coleta de oócitos, tais como: a coleta *post mortem*, caracterizada pela aspiração de folículos ovarianos provenientes de ovários coletados de vacas abatidas em abatedouros comerciais; ou a coleta *in vivo* através da laparotomia ou laparoscopia, também pela técnica da aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom *Ovum Pick Up* (OPU) (Varago *et al.*, 2008; Santos, 2022).

Para a PIVE, no laboratório, três etapas são necessárias: maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) dos embriões (Varago, Mendonça e Lagares, 2008).

3.3 Maturação *in vitro* de oócitos bovino

Essa etapa é composta por modificações ocorridas no núcleo e citoplasma da célula (Rao *et al.*, 2022), sendo a expansão das células do complexo *cumulus oophorus* (COC) sinalizadora da etapa da maturação oocitária (Figura 1) (Gupta *et al.*, 2005). Esse processo se caracteriza como uma etapa extremamente importante para a produção de embriões, pois promove condições para que estes possam alcançar potencial para o desenvolvimento embrionário. Fatores como a qualidade dos oócitos, modo de coleta e condições de cultura do embrião também implica o sucesso desta etapa (Mikkelsen, Smith e Lindenberg, 2000; Hatirnaz, 2018).



Figura 1. Oócitos após 24 horas de maturação com a expansão das células do complexo *cumulus oophorus* (COC) sinalizando a maturação. Fonte: Arquivo pessoal (2023).

Outro fator que influencia diretamente no sucesso da PIVE são as células do *cumulus* que promovem o aumento do número de espermatozoides fecundantes ao redor do oócito, gerando um microambiente facilitador para a capacitação espermática e fecundação, protegendo o oócito quanto ao enrijecimento da zona pelúcida. Elas compõem uma organização de nutrição e suporte sendo fundamentais para o crescimento e evolução da célula durante as etapas de MIV e Fertilização *in vitro* (FIV) (Palma, 2008; Sutton-McDowall e Thompson, 2015).

Quanto as modificações referentes ao citoplasma da célula, a realocação dos grânulos corticais é uma das mais importantes alterações que ocorrem pois evita a poliespermia sendo assim, importante para o processo de fecundação *in vitro*. Também há reserva de proteínas, RNA mensageiro e transcritos que foram sintetizados para que o zigoto suporte a transição materno-zigótica e torne-se embrião (Ferreira *et al.*, 2009; Gonçalves *et al.*, 2008; Varago *et al.*, 2008).

A maturação nuclear, *in vitro*, possui uma duração entre 18 e 22 horas (Rodrigues-Cunha *et al.*, 2015), condiz com a regulação da síntese proteica e adenosina trifosfato (ATP), separação cromossômica e organelas celulares (Ferreira *et al.*, 2009), envolvendo uma reorganização dos microtúbulos, rompimento do envoltório nuclear, condensação dos cromossomos, ocorrendo sucessivas divisões celulares (Figura 2) até a expulsão do primeiro corpúsculo polar e retenção na metáfase II (Figura 3) (Cha e Chian, 1998).

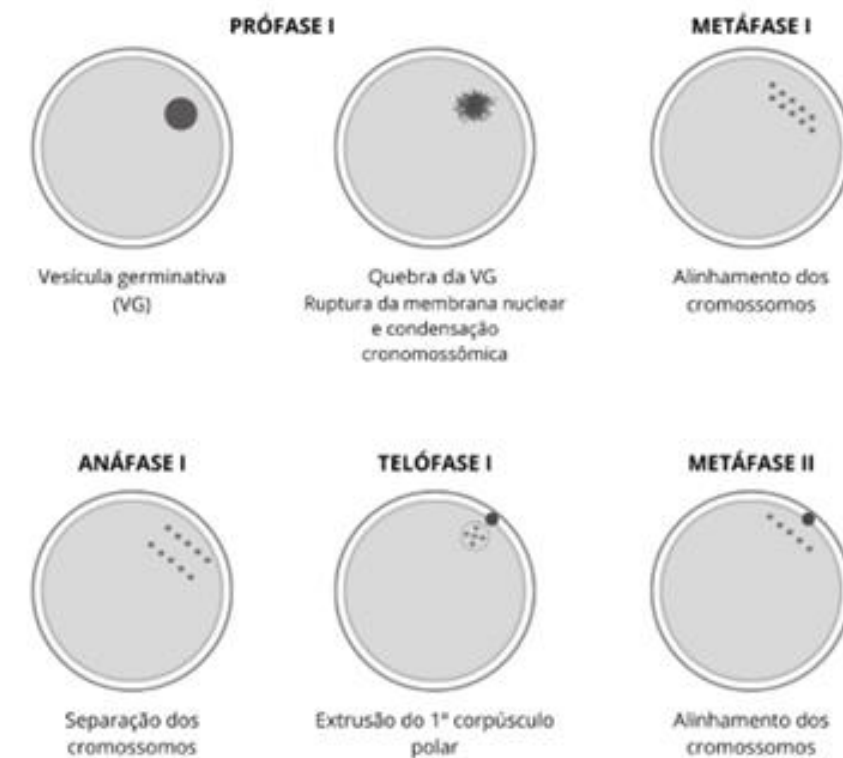


Figura 2. Etapas da maturação nuclear oocitária. Fonte: Embrapa (2014).







Figura 3. Oócito em metáfase II com extrusão do primeiro corpúsculo polar (P).
Fonte: Arquivo pessoal (2023).

A célula permanecerá em metáfase II até que ocorra a fecundação com o espermatozoide, e então, a partir deste evento a ativação do oócito ocorre dando continuidade às divisões meióticas, ocorrendo a expulsão do segundo corpúsculo polar, que por sua vez, sinaliza a ocorrência da fecundação (Varago *et al.*, 2008).

A maturação nuclear é referente ao retorno da meiose e continuidade da metáfase II, citados anteriormente, promovendo o preparo das organelas para a fertilização através de mudanças, por exemplo, nas mitocôndrias e aparelho de Golgi (Roelen, 2020; Rakha *et al.*, 2022). O conjunto de (alterações/modificações) bioquímicas e moleculares pelas quais passam os oócitos até a maturação deve ser controlado com rigor para que o gameta possua capacidade de ser fertilizado. (Wrenzycki e Stinshoff, 2013). Esta etapa é fundamental, pois, oócitos com maturação nuclear normal, mas com problemas em sua maturação citoplasmática não possuirão capacidade para serem fecundados e conseqüentemente não irão progredir no desenvolvimento embrionário (Bervers *et al.*, 2002).

Ao obter oócitos para realização da MIV, durante a etapa de seleção destas células deve ser realizada uma rigorosa avaliação quanto à sua qualidade. Assim, os oócitos podem ser classificados em quatro graus, como exposto no Quadro 1, conforme o proposto por Gonçalves *et al.* (2021) adaptado de Leibfried e First (1979).

Quadro 1. Classificação quanto aos graus de maturação do oócito

Grau	Descrição
I 	<p>Oócitos com <i>cumulus</i> compacto e mais de três camadas de células. Ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração marrom, sendo considerado viável.</p>
II 	<p>Oócitos com menos de três camadas de células do <i>cumulus oophorus</i>. 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 preenchendo todo espaço interior da zona pelúcida, também considerado viável.</p>
III 	<p>Possuem as células do <i>cumulus</i> presente, mas expandido. Ooplasma contraído, com espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida, preenchendo irregularmente o espaço perivitelino, degenerado, vacuolizado ou fragmentado. Sendo o último grau em que os oócitos são considerados viáveis.</p>
IV 	<p>Oócitos denominados desnudos sem a presença de células do <i>cumulus</i>, citoplasma com cor e granulação anormais ou com células expandidas com aspecto apoptótico. Esses oócitos são descartados, não passando para o processo de fertilização em laboratório.</p>

Fonte: Adaptado de Gonçalves (2021); imagens: arquivo pessoal.

3.4 Fertilização *in vitro* de oócitos bovino

Para fertilização *in vitro* ser realizada com eficácia os gametas necessitam ser preparados adequadamente (Dode e Rodvalho *et al.*, 2000). O preparo do sêmen se dá por técnicas que facilitam a dissociação das células espermáticas vivas dos demais componentes seminais e crioprotetores presentes. O *swim-up*, gradiente de Percoll e o lavado espermático são técnicas utilizadas, no entanto, é importante a utilização de um método que seja eficaz, acessível e recupere os espermatozoides móveis sem danificá-los e removendo as substâncias tóxicas e bioativas (Gonçalves, 2008).

Com os oócitos maturados, faz-se necessário para a FIV a utilização de espermatozoides descongelados, sendo o modo comumente utilizado para seleção de células viáveis a centrifugação em gradiente de Percoll 45-90%. E em seguida são quantificados os espermatozoides que serão utilizados através de contagem na câmara de Neubauer. A incubação possui duração de 12 a 24 horas, podendo variar, se o sêmen for sexado ou convencional (Rodrigues *et al.*, 2000).

Com a realização da FIV há início de diversas reações bioquímicas como o aumento da motilidade espermática, capacitação, reconhecimento de receptores presentes na zona pelúcida do oócito, reação acrossomal, junção na membrana plasmática do oócito para finalmente ser incorporado ao citoplasma (Dode e Rodvalho, 2000).

A capacitação das células espermáticas promove a remoção e alteração nas glicoproteínas periféricas, redução nos níveis de colesterol e alterações quanto à distribuição e composição de certos fosfolipídios da membrana espermática. Com estes eventos há exposição de fatores que proporcionam a interação entre oócito e espermatozoide, este, quando capacitado, e com o acrossoma intacto, atravessa as células do *cumulus* (Borges, 2008).

3.5 Cultivo *in vitro* de embriões bovinos

Com a maturação e fecundação realizadas, o zigoto será formado e passará por clivagens até ser denominado blastocisto. Mas, há um momento crítico posterior à fecundação onde ocorre a formação do pró-núcleo (Figura 4), com o reinício da segunda meiose, este ocorre, em virtude do embrião, no desenvolvimento inicial, depender do material genético que se acumulou durante a maturação até o estado de divisão em 8 a 16 células, denominada transição materno-zigótica (Blondin e Sirard, 1995; Minami, 1996; Brevini-Gandolfi e Gandolfi, 2001; Camargo *et al.*, 2001).

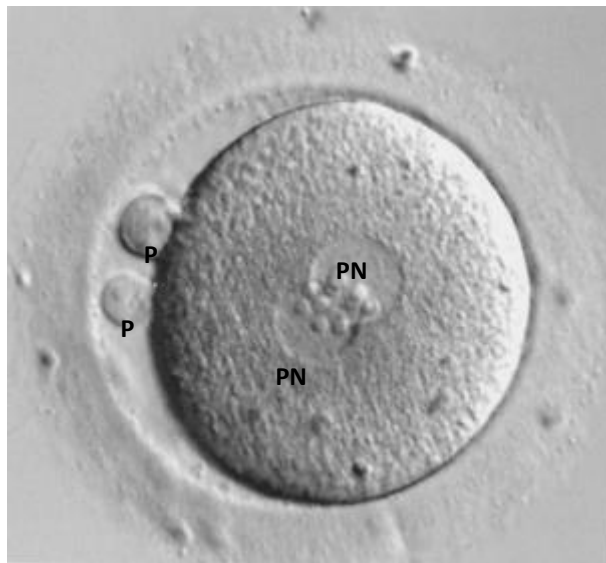


Figura 4. Oócito fertilizado com presença de dois pró-núcleos (PN) e dois corpúsculos polares (P). Fonte: Veeck (1999).

O cultivo embrionário *in vitro* (CIV), assim como a MIV e FIV, requer condições adequadas para seu sucesso. Com duração entre 7 a 9 dias, deve ocorrer em temperatura e atmosfera controladas e umidade saturada, para que, normalmente no 7º dia, a taxa de blastocisto seja avaliada (Gonçalves *et al.*, 2007; Varago *et al.*, 2008). O desenvolvimento embrionário antes da implantação possui etapas importantes como: a clivagem, ativação do genoma embrionário, a compactação dos blastômeros, diferenciação do trofoblasto e embrioblasto, preparo e desenvolvimento da blastocele, finalizando, com o rompimento da zona pelúcida (Lonergan *et al.*, 1999).

Os embriões e oócitos cultivados *in vitro* não têm defesas eficazes contra os estresses gerados devido as condições em que são manipulados no laboratório, isto quando comparado ao ambiente *in vivo*, por isso, pesquisas tem estudado a suplementação de substâncias

antioxidantes a fim de minimizar os danos oxidativos através da manutenção do estado redução-oxidação celular (Kitagawa *et al.*, 2004; Rocha-Frigoni *et al.*, 2015).

3.6 Características dos embriões produzidos *in vitro*

Os embriões produzidos *in vitro* (PIVE) apresentam uma zona pelúcida mais frágil, com menos células, uma ultraestrutura diferente quando comparado aos produzindo *in vivo* devido apresentarem mais lipídeos, menor quantidade de microvilosidade e alta quantidade de debris celulares (Crosier *et al.*, 2001; Abe *et al.*, 2002). Devido a estas diferenças, o embrião PIV possui menor taxa de criotolerância e prenhez (Morató *et al.*, 2010; Sudano *et al.*, 2014).

Visando a otimização na PIVE, cada vez mais, pesquisas têm sido realizadas com o intuito de observar e avaliar fatores intrínsecos e extrínsecos que possam comprometer o metabolismo e a aptidão do desenvolvimento em embriões PIV (Santos, 2022). Visto que, para bovinos, as taxas médias da produção de embriões obtidas estão variam entre 20 a 50% e de gestações de 30 a 40% (Camargo *et al.*, 2006).

Outro detalhe se dá referente a Glutathione (GSH), conhecida pelo seu potencial em proteger as células contra o estresse oxidativo. Nas condições *in vitro*, sua produção acaba sendo maior devido ao maior estresse celular proveniente de fatores como: interferência de luz, gases e a presença de espermatozoides presentes neste sistema (Wang *et al.*, 2002, Livingston *et al.*, 2009).

3.7 Fatores que interferem na produção de embriões *in vitro*

Pesquisas mostraram que o tamanho do oócito influencia na habilidade do oócito em recomeçar a meiose *in vitro*. Os aspectos referentes a morfologia nuclear e das células do *cumulus*, que são critérios de seleção para a realização da MIV, podem interferir na PIVE visto que em estudos realizados pode ser observado que oócitos com duas ou mais camadas de COC possuem capacidade em se desenvolver mesmo após 48 horas de cultivo, onde quando possuem apenas uma camada destas células se degeneram após este tempo (Nickson *et al.*, 1993, Luvoni *et al.*, 2005). Dessa forma, a importância dos COC pode ser observada estas são responsáveis pela transferência de nutrientes da granulosa para o oócito durante seu crescimento (Renton *et al.*, 1991).

A raça tem evidência como um fator que infere na competência de desenvolvimento oocitária e isto se reflete na qualidade dos oócitos devido a fatores genéticos ou citoplasmáticos maternos (Fischer e Bavister, 1993). Assim, raças para corte ou leite apresentam diferenças em suas taxas de blastocistos tornando-se mais evidentes nos estudos quando associados à condições ambientais, que também afetam na qualidade dos oócitos produzidos (Fischer *et al.*, 2000, Boediono *et al.*, 2003). Vacas *Bos taurus* como a exemplo as Holandesas, apresentaram oócitos com qualidade inferior as *Bos indicus* da raça Brahman na pesquisa realizada por Rocha *et al.* (1998).

Segundo Camargo *et al.* (2005), oócitos de novilhas mestiças *Bos indicus* de 4 a 7 meses de idade tiveram menor probabilidade em se desenvolverem em blastocistos após a FIV do que oócitos de vacas adultas. No entanto, os oócitos de novilhas mestiças de 9 a 14 meses de idade foram tão competentes quanto os oócitos de adultos. As raças dessa espécie possuem grande capacidade em controlar sua termorregulação, dessa forma, por esta característica de adaptação estes animais possuem melhor sobrevivência em climas quentes e isto pode se refletir na adaptação genética que resulta em um maior desenvolvimento e competência celular quando este gado está neste tipo de ambiente (Paula-Lopes *et al.*, 2003, Hansen, 2004,).

Um outro fator importante é o tempo de cultivo sabe-se que quanto maior o tempo de cultivo, maior será a progressão para o estágio de MII, assim como degeneração celular, embora todos os oócitos hábeis a maturarem apresentem a extrusão do primeiro corpúsculo polar após 24 horas de cultivo (Nickson *et al.*, 1993). Portanto, o ideal é que se consiga um equilíbrio entre o meio de cultivo utilizado e o período de incubação de forma a se obter melhores taxas de maturação com níveis de degeneração reduzidos.

A concentração de oxigênio também pode inferir visto que em algumas pesquisas pode ser observado que nas tensões de 5% e 20% em meios TCM 199 e CRML 1066, que são comumente utilizados para produção *in vitro*, houve taxas de maturação similares (Songsasen *et al.*, 2001). Também se tem estudado a comparação entre as baixas tensões de O₂ (5%) com tensões encontradas na atmosfera (20%) onde testar a baixa tensão é referente a tentativa em simular os níveis de oxigênio que são encontradas no trato reprodutivo desses animais (2-6%), como também, a fim de prevenir a formação das espécies reativas de oxigênio (Silva *et al.*, 2009, Fischer e Bavister, 1993).

E quanto aos meios utilizados, estes são suplementados com fontes proteicas como soro fetal bovino (SFB) e albumina sérica bovina (BSA) pois, para a espécie foi comprovada

a relação do seu uso com o aumento nas taxas de maturação oocitária e sobrevivência embrionária (Ribeiro, 2007).

3.8 Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) e Estresse Oxidativo (EO)

Naturalmente, o metabolismo celular produz as espécies reativas de oxigênio (EROS) decorrente de alterações na normalidade de fatores como: pH, temperatura, osmolaridade, alta-tensão de oxigênio (O₂) e tensão de CO₂, composição dos meios para cultivo e exposição a luz. Estas, quando em altas concentrações, resultam no estresse oxidativo da célula, fazendo com que esta perca sua qualidade alcançando até mesmo a inviabilidade para a produção de embriões *in vitro* (Silva *et al.*, 2010, Trindade *et al.*, 2016). Não se limitando apenas a isto, também pode se ocasionar a quebra do DNA durante a replicação, o que compromete a polimerização, e causa danos nas células, tecidos e, eventualmente, a apoptose celular (Costa *et al.*, 2022).

As EROS, *in vivo*, desempenham papéis fundamentais para que haja o desenvolvimento do oócito e ovulação (Rizzo *et al.*, 2012) se caracterizando como um processo fisiológico importante, que está ligado ao metabolismo celular e cuja síntese é desencadeada, tipicamente, durante a redução de oxigênio no interior da mitocôndria (Li *et al.*, 2017

Estes comprometimentos ocorrem devido ao processo de estresse oxidativo que gera desequilíbrio referente aos compostos oxidantes e antioxidantes, oriundo da grande quantidade de radicais livres ou pela velocidade em removê-los. Esse processo faz com que haja oxidação de biomoléculas com perda de funções e desequilíbrio homeostático (Halliwell e Whiteman, 2004). A ineficiência quanto as formas de minimizar as espécies reativas de oxigênio se caracteriza como um fator limitante dentro da PIVE (Takao *et al.*, 2015).

As espécies reativas de atuam desde a transdução de sinais intracelulares, especialmente relacionado com o controle do ciclo celular, até diferenciação e apoptose. Como são resultantes de reações intracelulares, a manipulação, tanto *in vitro* como *in vivo*, propicia a sua produção (Agarwal *et al.*, 2005; Agarwal *et al.*, 2008; Crocomo *et al.*, 2012). Desse modo, o estresse oxidativo se caracteriza como um agente primário na perda de qualidade oocitária. E, fatores como: idade da fêmea, nutrição, sanidade ou mesmo o acúmulo de danos às mitocôndrias, provenientes do metabolismo biológico diário acabam resultando nesse impacto (Bentov *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2019).

O estresse oxidativo é danoso às células da granulosa, podendo ocasionar perda de função, apoptose celular, atresia folicular e crescimento irregular (Lee *et al.*, 2013; Li *et al.*,

2016; Zhang *et al.*, 2016). Dentre as organelas, as mitocôndrias são as primeiras a se degenerar por serem local de origem das espécies reativas de oxigênio, pela cadeia transportadora de elétrons na respiração celular. Por isso, qualquer inferência nesta organela resulta em degeneração da granulosa e perda de qualidade folicular *in vitro* devido o comprometimento dos folículos ovarianos cultivados (Shi *et al.*, 2016; Hori *et al.*, 2013; Green, Brand e Murphy, 2004).

Quando na presença de compostos próximos, as EROS que são instáveis eletronicamente, tornam-se reativas e isso pode acarretar consequências referente ao recebimento de elétrons (agentes oxidantes) ou a doação de elétrons (agentes redutores). Na célula, a mitocôndria se caracteriza como local para produção desses compostos devido ao seu processo de respiração celular incluir O_2 . Devido a suas características químicas, o oxigênio acaba retendo uma alta reatividade resultando na produção dos radicais livres como exemplo: superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^-) (Ferreira e Matsubara, 1997; Menezo, 2016).

Não há como evitar em sua totalidade que o estresse oxidativo ocorra, no entanto, pode-se diminuir a produção de EROS durante a produção *in vitro* reduzindo a tensão de oxigênio durante o cultivo e/ou suplementando os meios de cultivo com substâncias que possuam propriedades antioxidativas (Trindade *et al.*, 2016). Já que estes, exercem um importante papel referente a diminuição dos impactos causados pelas espécies reativas de oxigênio (Andrade *et al.*, 2010; Ribeiro, 2005).

3.9 Antioxidantes e sua atuação

As substâncias antioxidantes podem ser definidas como um meio que quando em certas quantidades, em comparação ao substrato oxidável é capaz de inibir ou atrasar de forma eficaz a oxidação (Barbosa *et al.*, 2010), minimizando assim, a ação das EROS impedindo sua origem e o impacto destes radicais (Clarkson e Thompson, 2000, Koury e Donangelo, 2003).

Os antioxidantes são compostos basicamente por: enzimas, aminoácidos, substratos energéticos e compostos fenólicos, podendo ser categorizados como não enzimáticos e enzimáticos. Os não-enzimáticos atuam protegendo os alvos da oxidação, assim promovendo a inibição e eliminação ou mesmo inativando a oxidação. São exemplos desses: ácido ascórbico, tocoferol, selênio, zinco, taurinas e hipotaurinas, glutathione, piruvato, betacaroteno, caroteno, cistina, entre outros (Andrade, 2010; Leite, 2003; Ribeiro, 2005).

Os antioxidantes enzimáticos, atuam como sequestradores das espécies reativas de oxigênio e quelantes. Estes contêm os radicais livres controlando assim, suas concentrações. Os quelantes têm capacidade de se complexarem com íons metálicos, assim bloqueando as formações de EROS, principalmente a hidroxila (Gutteridge e Halliwell 2000; Hosaka *et al.*, 2005; Leite, 2003).

Estes compostos normalmente atuam convertendo as espécies reativas de oxigênio em água a fim de evitar a sua alta concentração (Silva *et al.*, 2010). Dessa forma, os antioxidantes podem ser utilizados nos meios de cultura para a produção *in vitro* a fim de proteger os oócitos e embriões do estresse oxidativo. Atuando na prevenção e retardo, ou diminuição dos danos originados durante esta produção (Costa, 2022).

Devido à capacidade em minimizar o EO oferecendo um ambiente similar ao *in vivo*, também são utilizados por sua capacidade de controle ao estresse oxidativo proveniente da modulação positiva dos compartimentos celulares (Costa *et al.*, 2022).

Dentre tantos antioxidantes existentes há a Glutationa (GSH) que possui um certo destaque por ser o maior e mais importante composto tiol-sulfidril não protéico, presente em todas as células de mamíferos. Ela atua possui alto potencial na proteção celular sob os danos causados às células devido as EROS e mantendo ainda o potencial redox intracelular (Luberda, 2005).

Além disso, a GSH exerce efeito na descondensação do material genético espermático e formação do pro-núcleo masculino (Abeydeera *et al.*, 1998). Assim, a glutathiona pode ser utilizada para analisar a maturação bioquímica, sua viabilidade e o potencial desenvolvimento oocitário, devido ao seu potencial como marcador (Zuelke *et al.*, 2003).

Pesquisas realizadas certificam a melhora de forma espontânea na meiose, aumento do armazenamento da glutathiona (GSH) e por sua vez contribuindo na proteção embrionária de oxidações nos estágios de desenvolvimento inicial e pré-implantação (Khazaei *et al.*, 2021). São exemplos, a transferrina, selênio e ácido ascórbico, amplamente utilizados com resultados expressivos, mas, não têm efetividade as necessidades observadas nesses sistemas *in vitro* (Luz *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2014). Assim, realizar estudos com a finalidade em caracterizar e explorar melhores compostos alternativos naturais se faz necessário para avaliar se há influência manutenção do equilíbrio redox (Costa *et al.*, 2022).

Estratégias vêm sendo pesquisadas a fim de otimizar as produções *in vitro* adicionando aos meios utilizados, substâncias com as propriedades antioxidantes (Costa *et al.*, 2022). Pois, mesmo com a notória contribuição dos antioxidantes para a produção de embriões, ainda há

necessidade em mais pesquisas sobre as vias de uso, concentração de componentes e também quanto à busca de novos componentes com propriedades antioxidantes que sejam seguros para o uso (Amaral, 2022).

3.10 Tanino (TA) e seu mecanismo de ação

Até o momento, os resultados obtidos em termos de qualidade oocitária e produção de blastocisto são variáveis, justificando a necessidade de se avaliar novos agentes capazes de atuar no controle do estresse oxidativo e modular o funcionamento dos oócitos. Neste caso tem-se o tanino (TA), que está incluso numa classe de compostos que pode ser encontrado em uma gama de alimentos à base de plantas, especificamente frutas vermelhas, café, nozes e feijões. Este, por sua vez, se caracteriza sendo um poderoso antioxidante, portanto, exibe várias propriedades farmacológicas, como: habilidades antitóxicas, anticancerígenas, antialérgicas, antivirais e antibacterianas (Chung *et al.*, 1998; Kaczmarek *et al.*, 2020; Nagesh *et al.*, 2020).

Este também se encontra presente no trato reprodutivo de indivíduos do sexo feminino e masculino (Roychoudhury *et al.*, 2017), sendo atuante na saúde e desenvolvimento dos folículos ovarianos, regulação de hormônios reprodutivos como o hormônio folículo-estimulante (FSH), a progesterona (P4) e o hormônio luteinizante (LH) *in vivo* (Manzoor *et al.*, 2020). Além disso, a oportunidade de explorar substâncias fitogênicas como o tanino, ganhou atenção na nutrição dos rebanhos como alternativas naturais de aditivos alimentares a antibióticos para melhorar o desempenho produtivo e reprodutivo do rebanho (Sallam *et al.*, 2018).

Quando utilizados em experimentações *in vivo* o tanino mostrou-se um potente modulador na capacidade em fertilização (Spinaci *et al.*, 2018), também sendo capaz de aumentar os níveis de GSH (Glutathione) e diminuir as ROS durante a MIV (Spinaci *et al.*, 2019). E na espécie suína diminuiu a polispermia devido a inibição de atividade da hialuronidase presente no sêmen desses animais (Tatemoto *et al.*, 2006).

Em experimentos *in vitro*, o TA exerceu um poderoso efeito biológico na modulação fina da capacidade de fertilização do espermatozoide (Spinaci *et al.*, 2018), enquanto a suplementação de TA para sêmen de varrões descongelados, também pode melhorar a eficiência da fertilização *in vitro* (Galeati *et al.*, 2020). Além disso, a suplementação com TA reduziu as EROs e aumentou o nível de GSH durante a MIV (Spinaci *et al.*, 2019).

Mas ainda assim, os mecanismos de atuação do tanino não são conhecidos e as informações quanto as atividades nas células germinativas femininas precisam ser mais elucidadas, especialmente, no desenvolvimento das células germinativas femininas. (Yin, 2021).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho experimental

Durante a maturação, como descrito anteriormente, os COCs foram sendo submetidos a tratamentos com diferentes concentrações de Tanino (Sigma), correspondendo aos grupos experimentais: TA0 = sem adição de Tanino (controle); TA1 = 1 µg/mL de Tanino; TA10 = 10 µg/mL de Tanino e TA100 = 100 µg/mL de Tanino. Após a maturação, os COC foram desnudados e submetidos à avaliação da maturação nuclear.

4.2 Coleta de oócitos e maturação *in vitro* (MIV)

Ovários de vacas adultas foram obtidos em abatedouro comercial e transportados ao Laboratório de Biotécnicas Aplicadas à Reprodução – LBR, no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco – SEDE. Estes foram lavados em solução salina (0,9% NaCl) a 38 °C, contendo solução antibiótico/antimicótico (Ab/Am; 100 U/mL penicilina, 100 µg/ml estreptomicina e 0,25 µg/mL amfotericina B; Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Folículos antrais entre 2-8 mm de diâmetro foram aspirados com agulha 18 G conectada a seringa de 10 mL. Os aspirados foliculares foram agrupados em tubo cônico e permitido sedimentar por 10 min (Figura 5).

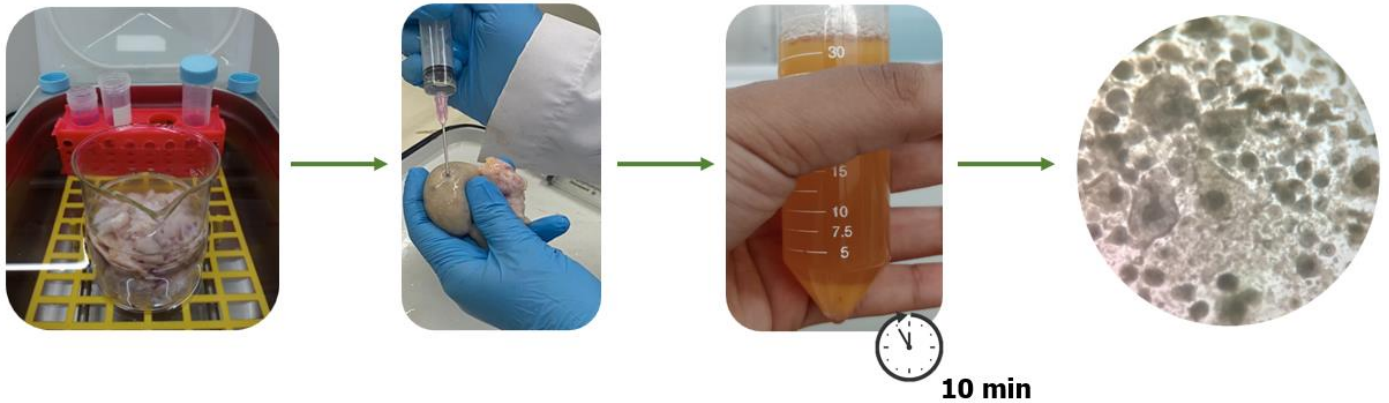


Figura 5. Aspiração dos folículos antrais e recuperação oocitária.
 Fonte: Arquivo pessoal (2023).

Após sedimentação, os complexos *cumulus oophorus* (COC) foram recuperados do fluido folicular, separados e lavados três vezes em Meio de Cultura de Tecidos 199 (TCM199/HEPES; Gibco, Life Technologies) suplementado com gentamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Apenas COCs com citoplasma homogêneo e uma ou mais camadas de células do *cumulus* compactas foram selecionados, lavados e alocados em gotas de 100 μL de meio de maturação em placas de petri 35 mm (Nunc, Roskilde, Dinamarca). As gotas foram cobertas com óleo mineral e incubadas por 24 horas a 38,8 °C com 5% de CO₂ e umidade máxima. O meio de maturação consistiu em TCM199/Bicarbonato (Gibco, Life Technologies), suplementado com 10 μg de FSH, 10 μg de LH, 2 mM de L-glutamina, 0,3 mM de piruvato de sódio, e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina (Figura 6).

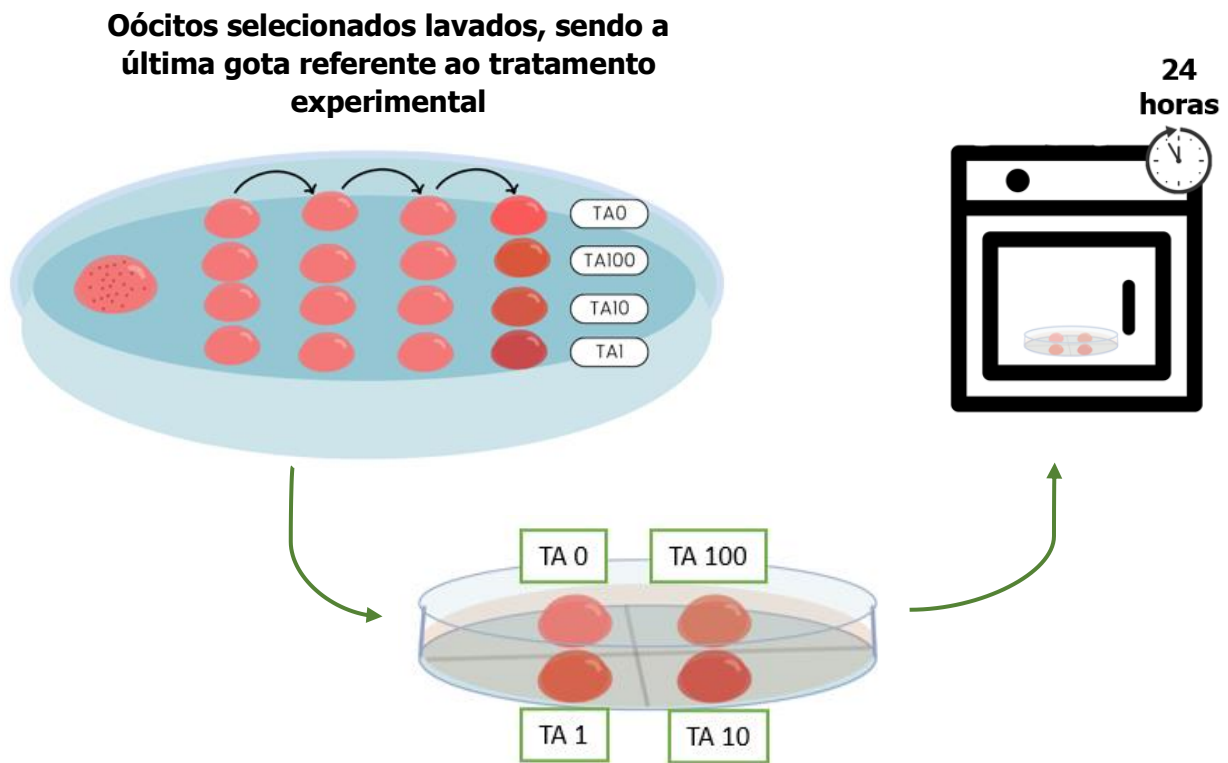


Figura 6. Esquema referente ao processo de maturação *in vitro*. Fonte: Arquivo pessoal (2023).

4.3 Avaliação do estágio meiótico

Após a maturação, uma parte dos oócitos foram separados e as células do *cumulus* foram removidas mecanicamente através de cuidadosas pipetagens em PBS-PVP contendo hialuronidase a 0,1%. Os oócitos desnudos foram incubados com 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33342 em PBS-PVP por 20 min à temperatura ambiente, lavados três vezes em PBS-PVP e montados em lâminas com meio de montagem ProLong[®] Golg (Molecular Probes, Life Technologies, Eugene, OR, USA), cobertos por lamínulas suportadas por colunas de parafina e seladas com verniz para unhas (Figura 7). A maturação nuclear completa foi mensurada em termos de taxa de metáfase II (MII). As demais configurações foram classificadas como oócitos que reiniciaram o processo de meiose (taxa de metáfase I; MI) ou não (taxa de vesícula germinativa; GV) (Figura 8).

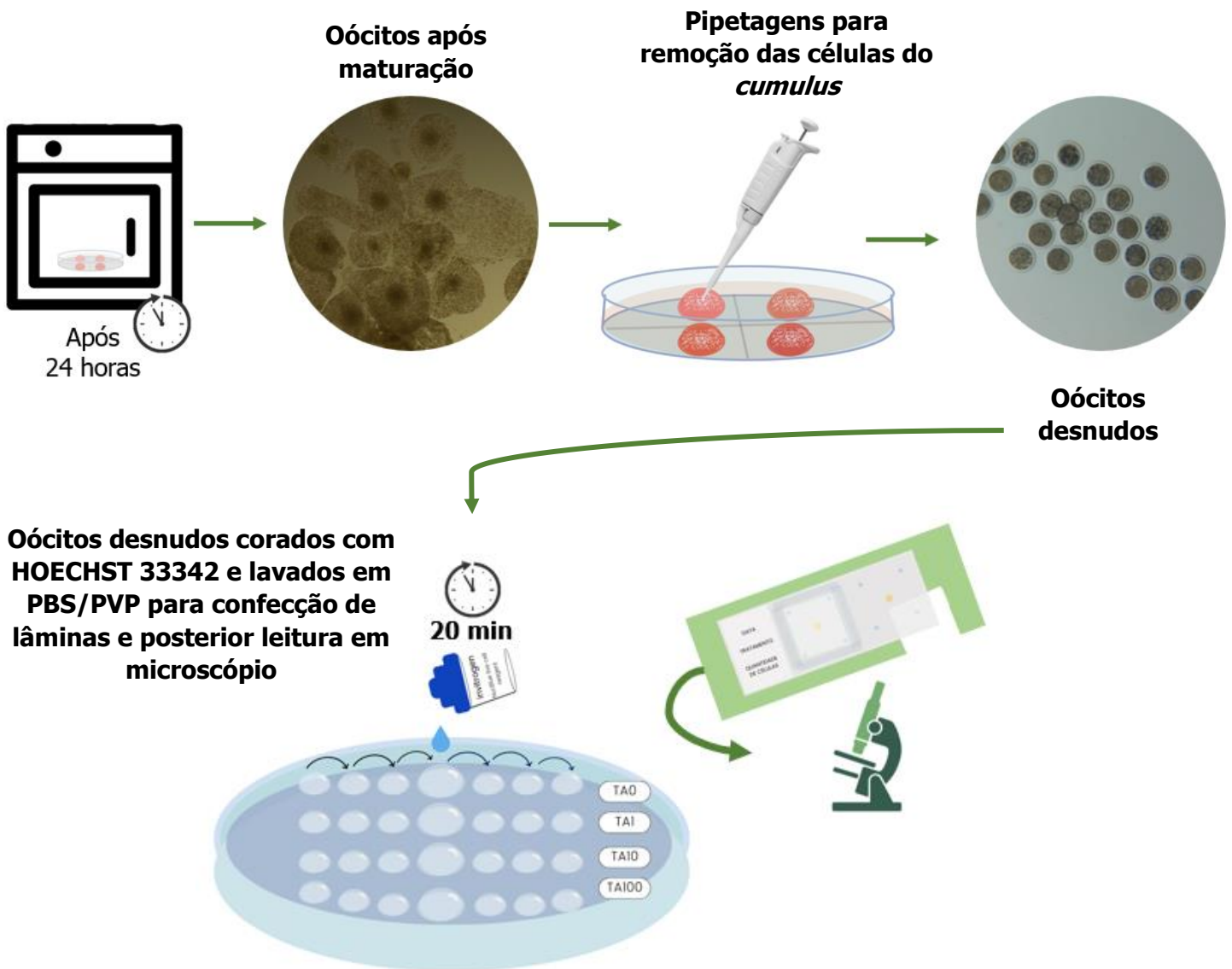


Figura 7. Processo para confecção de lâminas para avaliação do estado meiótico. Fonte: Arquivo pessoal (2023).

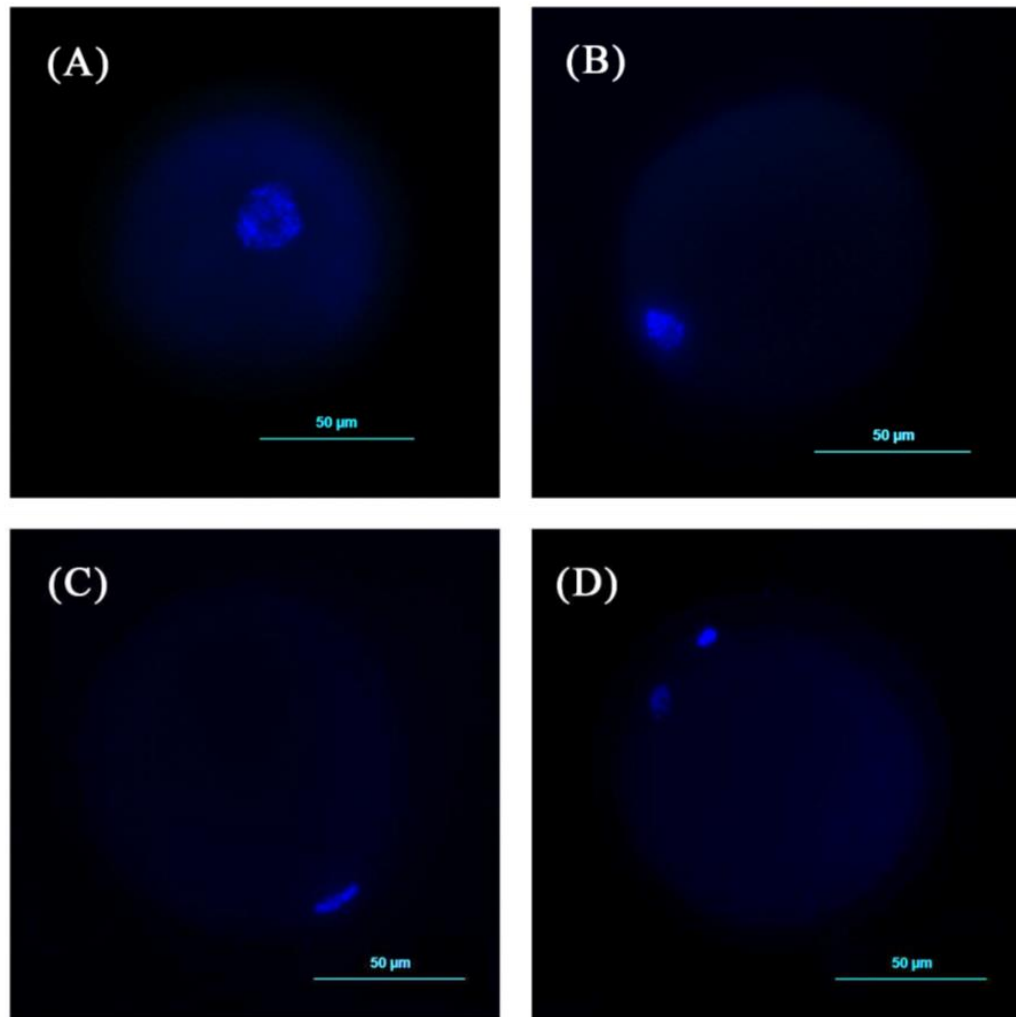


Figura 8. Oócitos corados com Hoechst 33342 para serem avaliados sob microscopia de fluorescência. Podendo ser observados oócitos em vesícula germinativa (GV, A), quebra da vesícula germinativa (GVBD, B), metáfase I (MI, C), e metáfase II (MII, D). Fonte: Gomes, *et al.* (2018).

4.4 Preparação espermática e fertilização *in vitro* (FIV)

Espermatozoides móveis obtidos a partir de sêmen criopreservado de bovinos, foram preparados por centrifugação (15 min a 700 g) em 4 mL de um gradiente de Percoll® (45/90%), de acordo com a metodologia descrita por Batista *et al.* (2011). A concentração espermática foi examinada em câmara de Neubauer. Grupos de 15-20 oócitos submetidos à maturação *in vitro* foram transferidos para gotas de 100 µL de meio TALP-fert suplementado com 1 µg/mL de hipotaurina sob óleo mineral. Os oócitos foram co-cultivados, em microgotas de 100 µL, sob óleo mineral, à temperatura de 38,5 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de

N₂, com espermatozoides capacitados em uma concentração final na gota de 1×10^6 spz/mL (Figura 9).



Figura 9. Processo de capacitação para inseminação dos oócitos maturados. Fonte: Arquivo pessoal (2023).

4.5 Cultivo embrionário (CIV)

Após 18 horas da fertilização, espermatozoides e células do *cumulus* foram removidas mecanicamente dos oócitos. Os prováveis zigotos foram lavados 4 vezes em meio de cultivo (fluido de oviduto sintético – SOF) e transferidos para microgotas de 100 µL, sob óleo mineral, à temperatura de 38,5 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂ durante 7 dias. No entanto, no segundo dia após a fertilização se foi observado sob microscópio as taxas de clivagem (Figura 10).

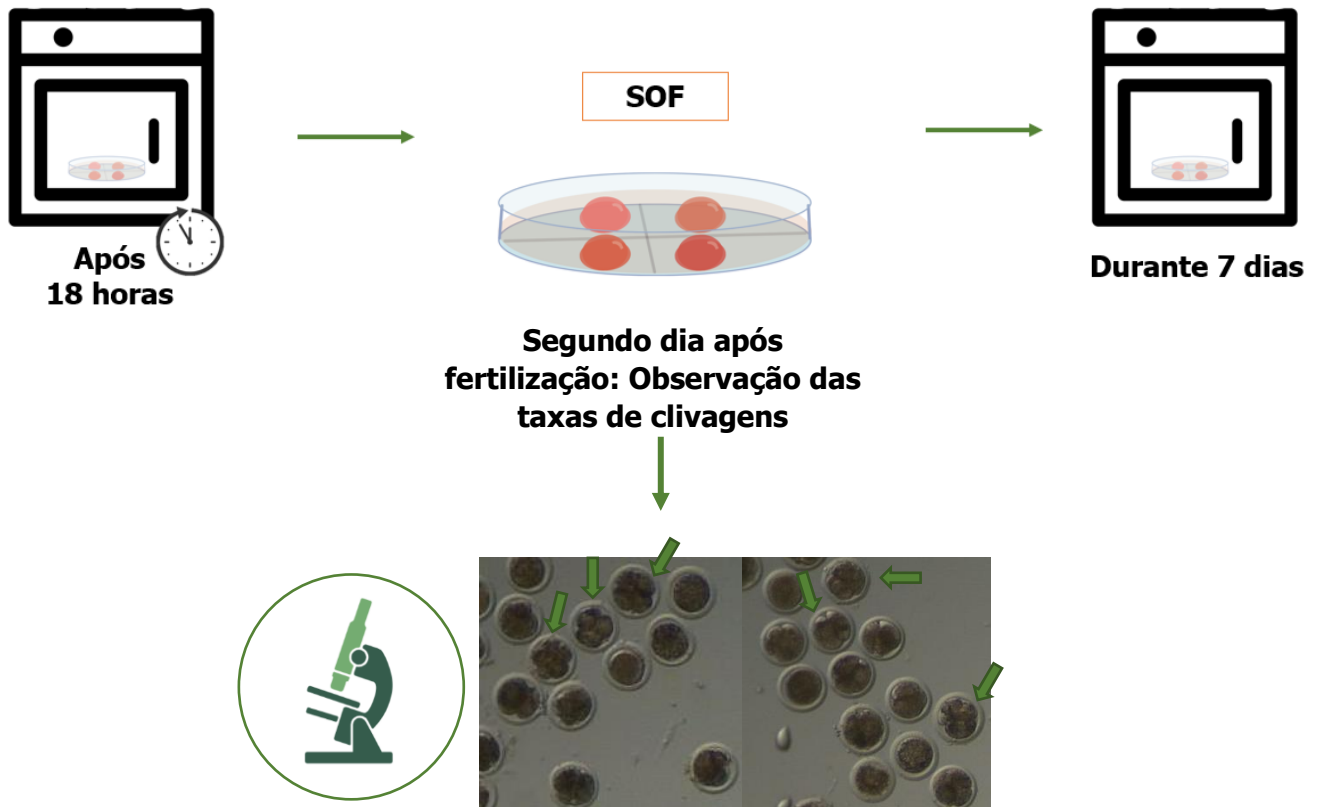


Figura 10. Cultivo celular e observação referente as taxas de clivagem, seta verde sinalizando células que apresentaram clivagem no segundo dia após fertilização. Fonte: Arquivo pessoal (2023).

4.6 Análises estatísticas

Todos os dados foram checados para normalidade e transformados quando necessário. Para todas as análises estatísticas, o PROC GLM do SAS para Windows, versão 9.2 (SAS Institute, Inc, Cary, NC, USA), foi utilizado. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4.7 Etapa pré experimental

Devido à necessidade da realização da experimentação com técnica e rigor, algumas semanas referentes ao trabalho foram dedicadas para a realização de: treinamento, capacitação e aperfeiçoamento das técnicas necessárias. Toda semana, foram realizadas baterias de modo a proporcionar prática concernente as etapas da PIVE.

Inicialmente os treinamentos concentraram-se no aperfeiçoamento de técnicas e uso adequado de pipetadores, visando à preparação de meios de cultivo, preparação de gotas de cultivo e manipulação de gametas; treinamento em técnicas de aspiração folicular conforme a disponibilidade de material. E sequencialmente, no laboratório, os ovários obtidos de vacas adultas abatidas em abatedouro comercial foram submetidos à aspiração dos folículos.

Após as aspirações, os oócitos foram selecionados e submetidos à MIV e, após a maturação, a expansão das células do *cumulus* pode ser observada (Figura 11A). Em seguida sendo submetidas à remoção das células do *cumulus* por pipetagem (Figura 11B) e posteriormente utilizadas para confecção de lâminas para a avaliação da maturação meiótica.



A. Células após maturação.



B. Células desnudadas para o cultivo.

Figura 11. A. Oócitos maturados e selecionados para confecção das lâminas; B. Oócitos sem as células do *cumulus*, desnudas para realização do cultivo (CIV).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na realização da maturação *in vitro* (MIV) foram obtidos resultados e taxas similares para todos os tratamentos TA0 (79,31%) TA1 (72,63%) TA10 (80,95%) TA100 (73,11%). Podendo ser observada uma correlação destes resultados com a expansão das células do *cumulus* durante as baterias realizadas (Figura 12). Referente as taxas de clivagem obtidas depois da fertilização dos oócitos, foi observado que os tratamentos TA0 (73,13%) TA1 (63,38%) TA10 (70,90%) apresentaram resultados semelhantes, no entanto, o tratamento T100 (47,91%) apresentou efeito deletério devido a diminuição significativa nas taxas de clivagem (Tabela 2).

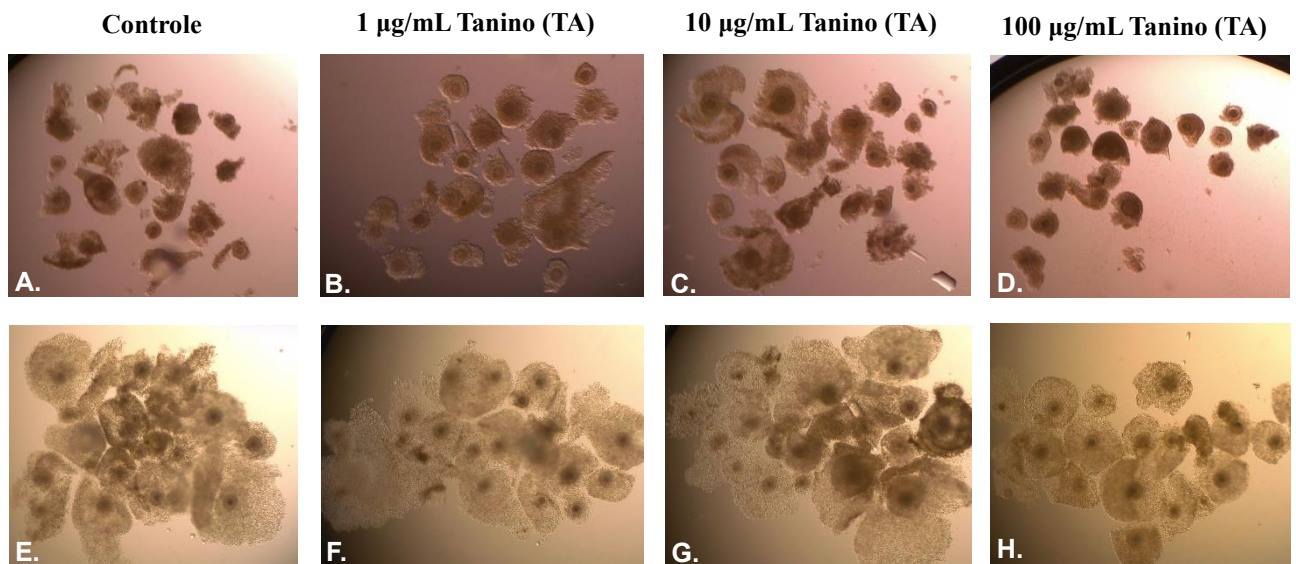


Figura 12. Avaliação da expansão das células do *cumulus oophorus* após 24 horas de maturação *in vitro*: (A, E) Grupo controle; (B, F) 1 µg/mL TA, (C,G) 10 µg/mL TA; (D,H) 100 µg/mL TA.

Tabela 2. Taxas de maturação e clivagem *in vitro* obtidas na realização do experimento.

	T0 - CONTROLE	TA1 - 1 µg/mL	TA10 - 10 µg/mL	TA100 - 100 µg/mL
MIV (%)	79,31 ^a	72,63 ^a	80,95 ^a	73,11 ^a
CLIV (%)	73,13 ^a	63,38 ^a	70,90 ^a	47,91 ^b

MIV % - Percentual de maturação *in vitro* dos oócitos. CLIV % - Percentual de clivagem *in vitro*.

Os resultados quanto a maturação se assemelham aos obtidos por Yin *et al.* (2021) e Sun *et al.* (2022), que utilizaram tanino na maturação de oócitos de porcas e observaram que não houve diferença significativa na maturação nuclear entre os tratamentos contendo 1 µg/mL e 10 µg/mL, quando comparado ao grupo controle. No entanto, para o tratamento contendo 100 µg/mL houve uma significativa redução quanto a taxa de maturação nuclear, quando comparado aos demais grupos estudados.

Apesar das taxas obtidas para a MIV e a expansão das células do *cumulus* se apresentarem similares para todos os tratamentos estudados, não significa que as células estão com todo seu conteúdo genético e organelas capacitadas para passar pelas demais etapas que compõem a produção *in vitro* de embriões. Por isso a importância em realizar a leitura das lâminas para análise referente ao estágio meiótico da célula após maturação. Pois, quando os oócitos estão em metáfase II (MII) da meiose apresentando extrusão do primeiro corpúsculo polar (Figura 13) é um indicativo quanto a eficácia da maturação oocitária.

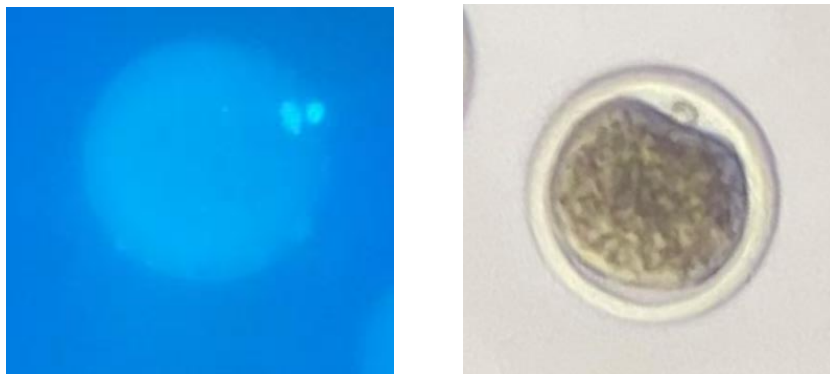


Figura 13. Oócito em metáfase 2 (a esquerda) corado com Hoeschst 33342 e com extrusão do primeiro corpúsculo polar (a direita).

A utilização de antioxidantes durante a MIV pode refletir em uma baixa taxa de blastocistos visto que as EROS, em sua formação equilibrada, atuam nos processos metabólicos durante a maturação e no desenvolvimento de blastocistos (Sabatini *et al.*, 1999, Guerin *et al.* 2001). E isto pode justificar o efeito deletério obtido com o tratamento TA100 referente as taxas de clivagens obtidas (47,91%), visto que a suplementação equilibrada com antioxidantes é fundamental e esta deve ser ajustada a fim de manter o equilíbrio entre a redução das espécies reativas de oxigênio e permitir que os processos de oxirredução celular sejam (Guemra *et al.*, 2013).

Os blastocistos observados no sétimo dia após a fertilização *in vitro* não resultaram em taxas significativas para discussão neste trabalho pois, o número de repetições possíveis para que pudesse ser gerado um resultado estatístico significativo, foram pequenas, sendo assim, não há como gerar resultados precisos referente a este aspecto. Podendo dessa forma, ser observado apenas a estrutura celular resultante, onde, há blastocistos para o tratamento T0 e T10 (Figura 14A e B) e aos demais tratamentos, até mesmo as clivagens se deram de forma inferior (Figura 14C e D).

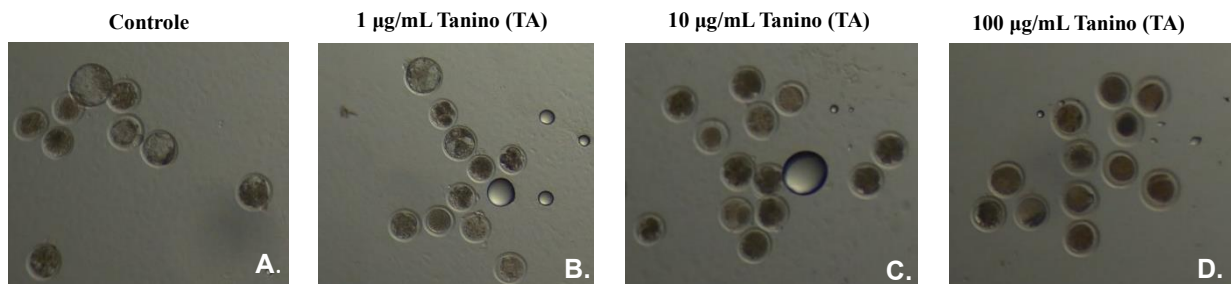


Figura 14. Observação de blastocistos ao sétimo dia após a fertilização *in vitro*: (A) Grupo controle; (B) 1 µg/mL TA, (C) 10 µg/mL TA; (D) 100 µg/mL TA.

Suplementar o meio de maturação com os antioxidantes aliado a um adequado controle das condições referente a temperatura, gases e manipulação pode promover o aumento quanto as taxas de produção de blastocistos (Guemra *et al.*, 2013). Sendo assim, possivelmente, com mais repetições resultados positivos para estas taxas poderiam ter sido obtidas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização do tanino no TA100 (100 µg/mL) apresentou características deletérias devido as baixas taxas de clivagens obtidas. Assim, para a suplementação em meios de maturação, recomenda-se que sejam utilizadas concentrações inferiores deste antioxidante para que suas propriedades otimizem a produção *in vitro*.

7 BIBLIOGRAFIA

ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Molecular Reproduction and Development**. 2002 Jan; v. 61, p. 1, p. 57-66. doi: 10.1002/mrd.1131. PMID: 11774376.

ABEYDEERA, L.R.; WANG, W.H.; CANTLEY, T.C.; PRATHER, R.S.; DAY, B.N. Presence of b-mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured *in vitro* and the rate of blastocyst development after *in vitro* fertilization. **Theriogenology**., v.50, p.747-56, 1998.

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology Endocrinology**, v. 3, n. 28, 2005.

AGARWAL, A. GUPTA, S.; SEKHON, L.; SHAH, R. Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: from molecular mechanisms to health implications. **Antioxidant Redox Signal**. v. 11, p. 375-403, 2008.

AMARAL, H. B. S. **Uso de antioxidantes na produção *in vitro* de embriões bovinos**. 2022. 29 f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências de Educação e Saúde, Centro Universitário de Brasília – CEUB, Brasília, 2022.

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 de 2010.

BARBOSA, K.B.F. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**. Campinas, v. 23, n. 4, p. 629-643, jul./ago., 2010.

BATISTA, A.M.; SILVA, S.V.; SOARES, A.T.; MONTEIRO JR, P.L.J.; WISCHRAL, A.; GUERRA, M.M.P. Comparison of CapriPure® and Percoll® density gradients for sperm separation of frozen-thawed goat spermatozoa. **Anim. Reprod**. v.8, p.81-84, 2011.

BEVERS, M.M.; IZADYAR, F. Role of growth hormone and growth hormone receptor in oocyte maturation. **Mol Cell Endocrinol**. v. 29, p.173-178. 2002.

BUDANI, M. C.; TIBONI, G. M. Effects of Supplementation with Natural Antioxidants on Oocytes and Preimplantation Embryos. **Antioxidants**. v. 9, p. 612. 2020.

BUENO, P. A.; BELTRAN, M. P. Produção *in vitro* de embriões bovinos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. v. 11, p. 1-7, 2008.

BORGES, M. S. M. **Produção *in vitro* de embriões bovinos**. 2008. 56 f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Goiás, Jataí, 2008.

BLONDIN, P.; SIRARD, M. A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction & Development**, v. 41, p. 54-62, 1995.

BREVINI-GANDOLFI T. A. L.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v. 55, p. 1255-1276, 2001.

BENTOV, Y., *et al.* The contribution of mitochondrial function to reproductive aging. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 28, n. 9, p. 773–783, 2011.

BOEDIONO, A; SUZUKI, T; GODKE, R.A. Comparison of hybrid and purebred *in vitro*-derived cattle embryos during *in vitro* culture. **Anim Reprod Sci**, v.78, p.1-11, 2003.

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. **Animal Reproduction**, v. 3, p. 19-28. 2006.

CAMARGO, L. S. A.; SÁ, W. F.; FERREIRA, A. M.; VIANA, J. H. M. Efeito de sistema de cultivo, célula somática e soro em co-cultura sobre o desenvolvimento de embriões bovinos fecundados *in vitro*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, 2001.

CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; VALE FILHO, V.R. Developmental competence of oocytes from prepubertal *Bos indicus* crossbred cattle. **Anim Reprod Sci**, v.85, p.53-59, 2005.

CHA, K. Y. e CHIAN, R. C. Maturation *in vitro* of immature human oocytes for clinical use. **Human Reproduction Update**. v. 4, n. 2, p. 103-120, 1998.

CHUNG, K.-T.; WONG, T. Y.; WEI, C. I.; HUANG, Y.-W.; LIN, Y. Tannins and Human Health: A Review. **Critical Reviews in Food and Science Nutrition**. Nutrition., v. 38, p. 421-464, 1998.

CLARKSON, P. M.; THOMPSON H. S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health. **Clinical Nutrition**, v. 72, n. 2, p. 637-46, 2000.

COSTA, F. C.; ERLÂNDIA, M. V.; SILVA, J. R. V.; BATISTA, A. L. P. S. Influência das espécies reativas de oxigênio durante o cultivo *in vitro* de oócitos e folículos ovarianos de mamíferos domésticos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 46, n. 1, p. 28-42, jan./mar., 2022. DOI: 10.21451/1809-3000.RBRA2022.003.

COSTA, F. C.; VASCONCELOS, E. M.; SILVA, J. R. V.; BATISTA, L. P. S. Influência das espécies reativas de oxigênio durante o cultivo *in vitro* de oócitos e folículos ovarianos de mamíferos domésticos. **Rev. Brasileira de Reprodução Animal**, v. 46, n. 1, p. 28-42, 2022.

COGNIÉ, Y.; BARIL, G.; POULIN, N.; MERMILLOD, P. Current status of embryo technologies in sheep and goat. **Theriogenology**, v. 59, n. 1, p. 171-188, 2003.

CROCOMO, L.; MARQUES FILHO, W. C.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; BICUDO, S. D. Produção de embriões *in vitro*: estresse oxidativo e antioxidantes. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, n. 4, p. 470-479, 2012.

- CROSIER, A. E. *et al.* Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced *in vivo* or *in vitro*. **Biology of Reproduction**. v. 64, n. 5, p. 1375-1378, 2001.
- DODE, M. A. N.; RODOVALHO, N. C. M.; UENO, V. G.; ALVES, R. G. O. Efeito do tamanho do folículo na maturação nuclear e citoplasmática de ovócitos de fêmeas zebuínas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília. v. 35, n. 1, p. 207-217, 2000.
- GOMES, E.T.; COSTA, J.A.S.; SILVA, D.M.F; AL SHEBLI W.; AZEVEDO, M.L.; MONTEIRO, P.L.J.; SILVA, A.J.R.; SANTOS FILHO, A.S.; GUERRA, M.M.P.; BARTOLOMEU, C.C.; WISCHRAL, A.; BATISTA, A.M. Effects of adiponectin during *in vitro* maturation of goat oocytes: MEK 1/2 pathway and gene expression pattern. **Reprod Domest Anim**. v. 53, n. 6, p. 1323-1329, 2018.
- FERREIRA, E.; VIREQUE, A.; ADONA, P.; MEIRELLES, F.; FERRIANI, R.; NAVARRO, P. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, p. 836–848. 2009.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 1-16, 1997.
- FISCHER, B.; BAVISTER, B.D. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. **Journal Reproduction Fertility**. v.99, p. 673-679, 1993.
- FISCHER, A.E.; BERNAL, D.P.; GUTIERREZ-ROBAYO, C; RUTLEDGE, J.J. Estimates of heterosis for *in vitro* embryo production using reciprocal crosses in cattle. **Theriogenology**, v. 54, p.1433-1442. 2000.
- FIGUEIREDO, J.R.; CELESTINO, J. J. H.; RODRIGUES, A.P.R.; SILVA, J.R.V. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 143-152, 2007.
- FONSECA, J. F.; CRUZ, R. C.; OLIVEIRA, M. E. F.; SOUZA-FABIAN, J. M. G.; VIANA, J. H. M. **Bioteχνologias Aplicadas à Reprodução de Ovinos e Caprinos**. Brasília: Embrapa, 2014.
- GALEATI, G.; BUCCI, D.; NEROZZI, C.; GADANI, B.; TAMANINI, C.; MISLEI, B.; SPINACI, M. Improvement of *in vitro* fertilization by a tannin rich vegetal extract addition to frozen thawed boar sperm. **Animal Reproduction**, v. 17, n. 2, 2020.
- GONÇALVES, P. B. D. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal e à humana**. 3. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2021.
- GONÇALVES, P. B. D. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. Rio de Janeiro: Roca, 2008.
- GONÇALVES P. B. D. *et al.* Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 212-217, 2007.

GUPTA, P. *et al.* Stimulation of *in vitro* ovine oocyte maturation with a novel peptide isolated from follicular fluid of the buffalo (*Bubalus bubalis*). **Small Ruminant Research**. v. 59, n. 1, p. 33–40, 2005.

GUTTERIDGE, J. M.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. **Annals of New York Academic Science**, v. 899, p. 136-147, 2000.

GUEMRA, S.; MONZANI, P.S.; SANTOS, E.S.; ZANIN, R.; OHASHI, O.M.; MIRANDA, M.S.; ADONA, P.R. Maturação *in vitro* de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. **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.

GREEN, K. *et al.* Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v. 53, p. 110-118, 2004.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and *in cell culture*: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231-255. 2004.

HANSEN PJ. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Anim Reprod Sci**, v.82/83, p.349-360, 2004.

HATIRNAZ, S. *et al.* Oocyte *in vitro* maturation: a systematic review. **Obstetrics & Gynecology**. v. 15, n. 2, p. 112-125, 2018.

HORI, Y.S.; KUNO, A.; HOSODA, R.; HORIO, Y. Regulation of FOXOs and p53 by SIRT1 Modulators under Oxidative Stress. **Plos One**, v. 8, n.9, e73875, 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. **Luminescence**, v. 20, n. 6, p. 419-427, 2005.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo 2021. Rio de Janeiro: IBGE, 2021.

KACZMAREK, B. Tannic acid with antiviral and antibacterial activity as a promising component of biomaterials: a minireview. **Materials**, v. 13, n. 14, e3224, 2020.

KHAZAEI, M.A.; VAISI-RAYGANI and AGHAZ, F. Meta-analysis of the addition of exogenous antioxidants to *in vitro* maturation medium: improved *in vitro* nuclear maturation of animal oocyte. **Iranian Journal of Applied Animal Science**, v. 11, n. 2, p. 217-227, 2021.

KITAGAWA, Y.; SUZUKIB, K.; YONEDAA, A.; WATANABEA, T. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive

- oxygen species (ROS), and DNA fragmentation on porcine embryos. **Theriogenology**, v. 62, n. 7, p. 1186-1283, 2004.
- KOURY JC, DONANGELO, C.M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 4, 2003. DOI: 10.1590/S1415-52732003000400007.
- LEE, L. *et al.* Changes in histone modification and DNA methylation of the Star and Cyp19a1 promoter regions in granulosa cells undergoing luteinization during ovulation in rats. **Endocrinology**, v. 154, n. 1, p. 458-470, 2013.
- LEIBFRIED, L. e FIRST, N.L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. **Animal Science**, v. 48, n. 1, p. 76-86, 1979.
- LEITE, H. P.; SARNI, R. S. Radicais livres, antioxidantes e nutrição. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 18, n. 2, p. 87-94, 2003.
- LUBERDA, Z. The role of glutathione in mammalian gametes. **Reprod. Biol.**, v.5, p.5-17, 2005.
- LUZ, V.B. *et al.* Kit ligand and insulin-like growth factor I affect the *in vitro* development of ovine preantral follicles. **Small Rumin Research**, v. 115, n. 1-3, p. 99-102, 2013.
- LINS, T.L.B.G. *et al.* Rutin can replace the use of three other antioxidants in the culture medium, maintaining the viability of sheep isolated secondary follicles. **Theriogenology**, v. 89, p. 263-270, 2017.
- LI, B. *et al.* Selection of antioxidants against ovarian oxidative stress in mouse model. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 31, n. 12, p. 1-6, 2017.
- LI, L.; WU, J.; LUO, M.; SUN, Y.; WANG, G. The effect of heat stress on gene expression, synthesis of steroids, and apoptosis in bovine granulosa cells. **Cell Stress Chaperones**, v. 21, n. 3, p. 467-475, 2016.
- LIVINGSTON, T.; RICH, K.; MACKENZIE, S.; GODKIN, J.D. Glutathione content and antioxidant enzyme expression of *in vivo* matured sheep oocytes. **Anim Reprod Sci.** v.116, p.265-73, 2009.
- LONERGAN, P. *et al.* Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 117, n. 1, p. 159-167, 1999.
- LUVONI, G.C.; CHIGIONI, S.; ALLIEVI, E.; MACIS, D. Factors involved *in vivo* and *in vitro* maturation of canine oocytes. **Theriogenology**, v. 63, p. 41-59, 2005.
- MANZOOR, F.; NISA, M.U.; HUSSAIN, H.A.; AHMAD, N.; UMBREEN, H. Effect of different levels of hydrolysable tannin intake on the reproductive hormones and serum biochemical indices in healthy female rats. **Scientific Reports**, v. 10, p. 1–8, 2020.

MENEZO, Y. J., E. SILVESTRIS, B. DALE, K. ELDER. Oxidative stress and alterations in DNA methylation: two sides of the same coin in reproduction. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 33, n. 6, p. 668-683, 2016.

MORATÓ, R. *et al.* Survival and apoptosis rates after vitrification in cryotop devices of *in vitro*-produced calf and cow blastocysts at different developmental stages. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, n. 2, p. 1141-1147, 2010.

MINAMI, N. Early embryonic development under oviductal influence *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 361-369, 1996.

MIKKELSEN, A.L.; SMITH, S.; LINDENBERG, S. Possible factors affecting the development of oocytes in in-vitro maturation. **Human Reproduction**, v. 15, n. 5, p. 11-17, 2000.

MIKKOLA, M.; HASLER, J.F.; TAPONEN, J. Factors affecting embryo production in super ovulated *Bos taurus* cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 32, n. 2, p. 104-124, 2019.

NAGESH, P.K.B.; CHOWDHURY, P.; HATAMI, E.; JAIN, S.; DAN, N.; KASHYAP, V.K.; CHAUHAN, S.C.; JAGGI, M.; YALLAPU, M.M. Tannic acid inhibits lipid metabolism and induce ROS in prostate cancer cells. **Science Reproduction**, v. 10, e. 980, 2020.

NICKSON, D.A.; BOYD, J.S.; ECKERSHALL, P.D.; FERGUSON, J.M.; HARVEY, M.J.A.; RENTON, J.P. Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and in vitro fertilization in bitches. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.47, p. 231-240, 1993.

OLIVEIRA, C. S.; SERAPIÃO, R. V.; QUINTÃO, C. C. R. **Biotécnicas da reprodução em bovinos**: minicursos ministrados durante o 3º Simpósio “Biotécnicas da Reprodução em Bovinos” no Laboratório de Reprodução Animal do Campo Experimental Santa Mônica. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2014.

PALMA, G. A. Producción *in vitro* de embriones bovinos. *In*: **Biotechnología de la reproducción**. 2. ed. Mar del Plata: El Paraiso, 2008, p. 313-380.

PINTO, P.H.N.; BALARO, M.F.A.; ARASHIRO, E.K.N.; Batista, R.I.T.P.; OLIVEIRA, M.E.F.; BRAGANÇA, G.M.; FERREIRA, J.F.; BRANDÃO, F.Z. Produção *in vivo* de embriões ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p. 208-216, 2017.

PAULA-LOPES, F.F.; CHASE JR, C.C.; AL-KATANANI, Y.M.; KRININGER 3RD, C.E.; RIVERA, R.M.; TEKIN, S; MAJEWSKI, A.C.; OCON, O.M.; OLSON, T.A.; HANSEN, P.J. Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. **Reproduction**, v.125,p.285- 294, 2003.

RAKHA, S.I. *et al.* Importance of antioxidant supplementation during *in vitro* maturation of mammalian oocytes. **Veterinary Science**, v. 9, p. 439. 2022.

RIBEIRO, S. M. R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

RIZZO, A. *et al.* Roles of reactive oxygen species in female reproduction. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 47, n. 2, p. 344–352, 2012.

RAO, B.; NAIDU, K.; AMARNATH, D.; VAGDEVI, R.; RAO, A.; BRAHMAIAH, K.; RAO, V. *In vitro* maturation of sheep oocytes in different media during breeding and non-breeding seasons. **Small Ruminant Research**, v. 43, p. 31–36, 2002.

RENTON, J.P. *et al.* Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch (*canis familiaris*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 93, n. 1, p. 221-231, 1991.

ROCHA, A; RANDEL, R.D.; BROUSSARD, J.R.; LIM, J.M.; BLAIR, R.M.; ROUSSEL, J.D.; GODKE, R.A.; HANSEL, W. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, 49:657-665, 1998.

RIBEIRO, A.P.C. Influência do estágio reprodutivo e suplementação do meio de cultivo com progesterona e/ou soro de cadela em estro, nas taxas de maturação *in vitro* de oócitos de fêmeas caninas. 129 f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) – **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias**, Universidade Estadual Paulista, 2007.

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

RODRIGUES-CUNHA, M, C, V. *et al.* Effects of melatonin during *in vitro* maturation in defined medium on oocyte meiosis, oxidative stress and subsequent embryo development. **Theriogenology**, v. 86, n. 7, p. 1685-1694, 2015.

RODRIGUES, C. F. M.; GARCIA, J. M. Fecundação *in vitro* em bovinos: aplicação comercial. **Arq. Fac. Vet. UFRGS Supl.**, v. 28, p. 186-187, 2000.

ROELEN, B. A. J. Bovine oocyte maturation: acquisition of developmental competence. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 32, n. 2, p. 98-103, 2020.

ROYCHOUDHURY, S.; AGARWAL, A.; VIRK, G.; CHO, C.-L. Potential role of green tea catechins in the management of oxidative stress-associated infertility. **Reprod. Biomed. Online**, v. 34, p. 487-498, 2017.

SABATINI, L.; WILSON, C.; LOWER, A. Superoxide dismutase activity in human follicular fluid after controlled ovarian hyperstimulation in women undergoing *in vitro* fertilization. **Fertil. Steril.**, v.72, p.1027-1034, 1999.

SANTOS, I. R. **Criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro***: uma revisão de literatura. 2022. 26 f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) - Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos – UNICEPLA, Brasília, 2022.

SANTOS, L. P. Protein localization of epidermal growth factor in sheep ovaries and improvement of follicle survival and antrum formation *in vitro*. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 49, n. 5, p. 783-789, 2014.

- SANTOS, L. P.; BARROS, V. R. P.; CAVALCANTE, A. Y. P.; MENEZES, V. G.; MACEDO, T. J. S.; SANTOS, J. M. S.; ARAÚJO V. R.; QUEIROZ, A. A.; MATOS, M. H. T. Protein localization of epidermal growth factor in sheep ovaries and improvement of follicle survival and antrum formation *in vitro*. **Reprod Domest Anim**, v. 49, n. 5, p. 783-789, 2014.
- SALLAM, S. M.; ATTIA, M. F.; EL-DIN, A. N. N.; EL-ZARKOUNY, S. Z.; SABER, A. M.; EL-ZAIAT, H. M.; ZEITOUN, M. M. Involvement of Quebracho tannins in diet alters productive and reproductive efficiency of postpartum buffalo cows. **Animal Nutrition**, v. 5, p. 80-86, 2018.
- SHI, L. *et al.* Long-term moderate oxidative stress decreased ovarian reproductive function by reducing follicle quality and progesterone production. **Plos One**, v. 11, n. 9, p. 1-18, 2016.
- SILVA, C. M. G., FAUTINO, L. R., SARAIVA, M. V. A., ROSSETTO, R., FIGUEIREDO, J. R. Influência da tensão de oxigênio na maturação oócitaria e cultivo *in vitro* de folículos e embriões. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 34, n. 4, p. 233-242, 2010.
- SILVA, A.E.F.; RODRIGUEZ, P.; CAVALCANTE, L.F.; RODRIGUES, B.A.; RODRIGUES, J.L. The influence of oxygen tension on cumulus cells viability of canine COCs matured in high-glucose medium. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 44 (suppl 2), p.259-262, 2009.
- SONGSASEN, N.; YU, I.; LEIBO, S.P. Effects of maturation media and oxygen concentration on nuclear maturation of canine oocytes. **Theriogenology**, v. 55, n.1, p. 494, 2001.
- SOUZA, L. C. B. PIVE e IATF aplicadas à reprodução de bovinos de corte. 2020. 40 f. Monografia (Graduação em Zootecnia) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2020.
- SPINACI, M.; BUCCI, D.; MUCCILLI, V.; CARDULLO, N.; NEROZZI, C.; GALEATI, G. A polyphenol-rich extract from an oenological oak-derived tannin influences *in vitro* maturation of porcine oocytes. **Theriogenology**, v. 129, p. 82-89, 2019.
- SPINACI, M.; MUCCILLI, V.; BUCCI, D.; CARDULLO, N.; GADANI, B.; TRINGALI, C.; TAMANINI, C.; GALEATI, G. Biological effects of polyphenol-rich extract and fractions from an oenological oak-derived tannin on *in vitros* wine sperm capacitation and fertilizing ability. **Theriogenology**, n. 108, p. 284–290, 2018.
- SUN, J.T.; LIU, J.H.; JIANG, X.Q.; LUO, X.; YUAN, J.D.; ZHANG, Q.; QI, X.Y.; LEE, S.; LIU, Z.H.; JIN, J.X. Tannin Reduces the Incidence of Polyspermic Penetration in Porcine Oocytes. **Antioxidants**, n. 11, p. 2027, 2022.
- SUTTON-MCDOWALL, M. L.; THOMPSON, J. G. Metabolismo do oócito e do embrião pré-implantação. **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões**. Gramado-RS. v. 29, p. 88-98. 2015.
- SUDANO, M.J.*et al.* Crucial surviving aspects for vitrified *in vitro*-produced bovine embryos. **Zygote**, v. 22, n. 2, 2014.

TAKAO, L. K.; IMATOMI, M.; GUALTIERI, S. C. Antioxidant activity and phenolic content of leaf infusions of Myrtaceae species from Cerrado (Brazilian Savanna). **Braz. J. Biol.**, v. 75, n. 4, p. 948-952, 2015.

TATEMOTO, H.; TOKESHI, I.; NAKAMURA, S.; MUTO, N.; NAKADA, T. Inhibition of boar sperm hyaluronidase activity by tannic acid reduces polyspermy during *in vitro* fertilization of porcine oocytes. **Zygote**, v. 14, p. 275–285, 2006.

TRINDADE, M. C.; MACENTE, B. I.; VICENTE, R. R. W.; APPARÍCIO, M. Estresse oxidativo na produção *in vitro* de embriões bovinos: Revisão de Literatura. **Revista Investigação Medicina Veterinária**, v. 15, n. 1, p. 37-45, 2016.

VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. de A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 2, p. 100-109, 2008.

VIANA, J. H. M. Estatísticas do mercado de embriões. **Jornal O Embrião**, v. 67, p. 26-31, 2021.

VEECK, L.L. An Atlas of Human Gametes and Conceptuses: An Illustrated Reference for Assisted Reproductive Technology. **CRC Press**, v.1, 1999.

WANG, X.; FALCONE, T.; ATTARAN, M.; GOLDBERG, J.M.; AGARWAL, A.; SHARMA, R.K. Vitamin C and Vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. **Fertil Steril**, v.78, p.1272-7, 2002.

WRENZYCKI, C.; STINSHOFF, H. Maturation environment and impact on subsequent developmental competence of bovine oocytes. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 48, n. 1, p. 38-43, 2013.

YIN, Z.; SUN, J.T.; CUI, H.D.; JIANG, C.Q.; ZHANG, Y.-T.; LEE, S.; LIU, Z.H.; JIN, J.X. Tannin Supplementation Improves Oocyte Cytoplasmic Maturation and Subsequent Embryo Development in Pigs. **Antioxidants**, v. 10, e. 1594, 2021.
DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox10101594>.

ZHANG, J.Q. *et al.* Critical role of Fox in granulosa cell apoptosis caused by oxidative stress and protective effects of grape seed procyanidin. **Oxid. Med. Cell Longev.** v., p. 1-15, 2016.

ZHANG, Y. *et al.* Rosmarinic acid treatment during porcine oocyte maturation attenuates oxidative stress and improves subsequent embryo development *in vitro*. **Peer Journal**, v. 7, e. 6930, 2019.

ZUELKE, K.A.; JEFFAY, S.C.; ZUCKER, R.M.; PERREAULT, S.D. Glutathione (GSH) concentration vary with the cell cycle in maturing hamster oocytes, zygotes, and preimplantation stage embryos. **Mol Reprod Dev.**, v.64, p.106-112, 2003.