



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**EXTRATO ETANÓLICO DE PLANTAS DO CERRADO NA
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS.**

ANDREI ANTONIONI GUEDES FIDELIS

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA
FEVEREIRO DE 2020



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA – FAV

**EXTRATO ETANÓLICO DE PLANTAS DO CERRADO NA
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS.**

ANDREI ANTONIONI GUEDES FIDELIS

ORIENTAÇÃO: DRA. MARGOT ALVES NUNES DODE

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 217D/2020

BRASÍLIA

FEVEREIRO DE 2020

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA – FAV

EXTRATO ETANÓLICO DE PLANTAS DO CERRADO NA PRODUÇÃO *IN VITRO*
DE EMBRIÕES BOVINOS

ANDREI ANTONIONI GUEDES FIDELIS

TESE DE DOUTORADO APRESENTADO AO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS ANIMAIS DA FACULDADE DE
AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA.

APROVADA POR:

Dra. Margot Alves Nunes Dode (Orientadora/Embrapa/UnB)

Dr. Maurício Machaim Franco (Examinador Externo/Embrapa/UFU)

Dr. Rodrigo Arruda de Oliveira (Examinador Interno/UnB)

Dr. Mateus José Sudano (Examinador Externo/ UFABC)

Dra. Carolina Madeira Lucci (Suplente/ UnB)

Brasília / DF, 07 de fevereiro de 2020.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

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

Documento formal, autorizando a reprodução desta Tese de Doutorado para empréstimo, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado pela Secretaria do Programa. O autor e sua orientadora reservam para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte desta Tese de Doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou da sua orientadora. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

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

1. Criopreservação. 2. Transferência Direta. 3. PIV. 4. Cinética embrionária. 5. Expressão Gênica. 6. Compostos fenólicos. 7. antioxidantes.

“What is there that is not poison? All things are poison and nothing is without poison. Solely the dose determines that a thing is not a poison,”

Paracelsus, 1493 - 1541

AGRADECIMENTOS

À minha família, fundamentais nos momentos mais necessários. Em especial à minha amada esposa Clarinha, por ser sempre presente, compreensiva e companheira. Não conseguiria chegar aqui sem você ao meu lado!

À Dra. Margot, por acreditar no nosso projeto. Por acreditar que seria possível. Por ser um exemplo de orientadora e de profissional.

Aos pesquisadores e colegas de pós-graduação da Embrapa Cenargen, pela grande colaboração nas pesquisas e nas discussões levantadas durante todos esses anos.

À Universidade de Brasília e à Embrapa Cenargen pela execução de todas as pesquisas.

E, à Deus, sempre presente em minha vida.

RESUMO

O cultivo *in vitro* induz uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO), que afeta a produção e qualidade dos embriões. Compostos antioxidantes sintéticos já foram utilizados para minimizar os efeitos deletérios do estresse oxidativo em embriões produzidos *in vitro* (PIVE) e, conseqüentemente, melhorar sua qualidade e criotolerância. Entretanto, a demanda para o uso por antioxidantes mais eficientes, estáveis, com propriedades relativamente seguras e não tóxicas é crescente entre os grupos de pesquisa. Portanto, o presente estudo avaliou o efeito de extratos etanólicos obtidos de folhas de plantas do cerrado, ricos em polifenóis, no cultivo de embriões bovinos. Quatro experimentos foram conduzidos para validar um extrato etanólico capaz de minimizar os efeitos adversos do estresse oxidativo e melhorar a qualidade embrionária. Em um primeiro momento, comparou-se o extrato etanólico de folhas secas de cinco plantas e selecionou-se as duas com a maior capacidade antioxidante e com o maior teor de compostos fenólicos. Após essa etapa, foi determinada a melhor concentração dos extratos etanólicos de cagaita (*Eugenia dysenterica*) e murici (*Byrsonima crassifolia*), a ser utilizada durante o cultivo *in vitro*, na produção e qualidade embrionária e na taxa de apoptose. Então, avaliou-se a influência da suplementação dos extratos na produção de ERO, de glutathiona (GSH) e na abundância de transcritos de genes relacionados à apoptose e ao metabolismo de ERO de blastocistos expandidos. Finalmente, foi avaliado o efeito da suplementação dos extratos etanólicos de folhas secas de cagaita e murici, durante o cultivo embrionário, na criotolerância dos blastocistos expandidos. Os resultados obtidos demonstraram uma redução ($p < 0,05$) na proporção de células apoptóticas de embriões cultivados com 0,01mg/mL de extrato etanólico de cagaita, além de induzir um aumento nos níveis de transcritos de GPX4 e PRDX3. O extrato etanólico de murici também induziu um aumento na abundância de transcritos desses genes mas não reduziu a proporção de células apoptóticas. Além disso, os blastocistos expandidos cultivados com os extratos, na concentração de 0,01mg/mL e criopreservados, pelo método de transferência direta, obtiveram taxas de eclosão maiores e de degeneração menores ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo congelado sem a suplementação prévia com os extratos. Ainda, a taxa de apoptose dos embriões cultivados por 12 horas após a criopreservação foi menor ($p < 0,05$) nos grupos previamente expostos aos extratos durante o cultivo *in vitro*. Conclui-se que tais extratos podem ser uma alternativa para aumentar a criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Palavras-chave: Antioxidantes; compostos fenólicos; criopreservação.

ABSTRACT

In vitro embryo production (IVP) induces excessive production of reactive oxygen species (ROS), which affects blastocyst quality. Therefore, the supplementation of culture media with antioxidants is an alternative to overcome oxidative stress damage. However, there is growing demand for the use of antioxidant compounds that are more natural and less toxic in cell cultures. Therefore, the present study aimed to evaluate the effect of ethanolic extracts from *cerrado* leaves on IVP. Four experiments were conducted to identify an ethanolic extract concentration that would minimize the adverse effects of oxidative stress and improve embryonic quality. First, the antioxidant capacity and the amount of phenolic compounds of the leaves were evaluated. Then, the best ethanolic extract concentration composed of cagaita (*Eugenia dysenterica*) and murici (*Byrsonima crassifolia*) to be used during the *in vitro* culture of *in vitro* produced embryos, was determined. Afterwards, we evaluated the influence of the extract of both plants on the embryos' oxidative metabolism and apoptosis, by ROS and glutathione (GSH) production, while also evaluating the apoptosis and ROS metabolism gene expression. In a subsequent step, the effect of the ethanolic extracts of dried cagaita and murici leaves during embryonic cultivation on the cryotolerance of expanded blastocysts was studied. The results showed a significant reduction ($p < 0.05$) in the proportion of apoptotic cells from embryos cultivated with 0.01 mg/mL of cagaita ethanolic extract, besides inducing an increase in the GPX4 and PRDX3 transcription levels. Murici ethanolic extract induced an increase in the transcription abundance of these genes but did not reduce the proportion of apoptotic cells. In addition, expanded blastocysts cultivated with extracts at a concentration of 0.01 mg/mL and cryopreserved had higher hatching rates and lower degeneration rates ($p < 0.05$) when compared to the frozen group previously supplemented with the extracts. Moreover, the apoptosis rate of embryos cultured for 12 h after cryopreservation was lower ($p < 0.05$) in groups previously exposed to extracts during *in vitro* cultivation. Such extracts may be used as alternatives to increase the cryotolerance of *in vitro* produced embryos.

Key words: Antioxidants; cryopreservation; phenolic compounds.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Objetivo geral	14
1.2 Objetivos específicos	14
2. REVISAO DE LITERATURA	15
2.1 Fatores que afetam a produção <i>in vitro</i> de embriões.	15
2.2 – Produção de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo.....	16
2.3 – Sistemas antioxidantes.....	18
2.4 Uso de antioxidantes na produção <i>in vitro</i> de embriões.	22
2.4.1 – Uso de compostos fenólicos como antioxidante.....	24
2.4.2 – Compostos fenólicos utilizados na produção <i>in vitro</i> de embriões.	25
2.4.3 – Criopreservação de embriões PIV cultivados com compostos antioxidantes.....	27
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
CAPÍTULO 2	39
1 RESUMO	40
2 ABSTRACT	41
3. INTRODUÇÃO.....	42
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1 Preparo dos extratos etanólicos de plantas nativas do cerrado.	45
4.1.1 Ensaio da atividade antioxidante pela captura de radical livre – ABTS.....	45
4.1.2 Ensaio de determinação de compostos fenólicos por Folin Ciocalteu.....	46
4.2 Produção <i>in vitro</i> dos embriões	47
4.2.1 Adição dos extratos etanólicos de folhas secas de cagaita e murici no meio de cultivo embrionário.....	48
4.3 Mensuração de atividade antioxidante no meio de cultivo embrionário pelo método ABTS.....	48
4.4 Contagem total de células embrionárias e de células apoptóticas pelo método de TUNEL.	48
4.5 Mensuração de espécies reativas de oxigênio intracelular de embriões.	49
4.6 Mensuração de glutathiona intracelular de embriões.	50
4.7 Síntese de cDNA e <i>polímerase chain reaction</i> (PCR) em tempo real.....	50
4.8 Criopreservação dos blastocistos expandidos.....	52
4.8.1 Descongelamento dos blastocistos expandidos	53
4.9 Delineamento experimental.	53
4.10 Análise estatística	56

5. RESULTADOS	58
EXPERIMENTO 1: Quantificação de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de plantas do cerrado brasileiro.....	58
EXPERIMENTO 2: Efeito de diferentes concentrações do extrato etanólico de folhas secas de cagaita e murici na produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos.	58
EXPERIMENTO 3: Efeito dos extratos etanólicos de cagaita e murici no estresse oxidativo de blastocistos produzidos <i>in vitro</i>	64
EXPERIMENTO 4: Efeito dos extratos etanólicos de folhas secas de cagaita e murici na criotolerância de blastocistos expandidos produzidos <i>in vitro</i>	69
6. DISCUSSÃO	72
7. CONCLUSÃO.....	76
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1. INTRODUÇÃO

Dentre as biotecnologias de reprodução assistida em bovinos, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) se destaca no cenário nacional, tanto na bovinocultura de corte quanto na bovinocultura de leite. Essa biotécnica permite a multiplicação rápida de animais geneticamente superiores e, conseqüentemente, proporciona um ganho genético bastante expressivo em um sistema produtivo. Nesse contexto, o Brasil assumiu uma posição de vanguarda ao consolidar-se, há mais de uma década, como um dos maiores produtores de embriões *in vitro* do mundo (VIANA et al, 2018). Entretanto, apesar dessa posição bastante significativa na produção embrionária, ainda há um desequilíbrio entre o número de embriões produzidos e a quantidade de receptoras aptas disponíveis. Diante desse entrave, a necessidade de criopreservar embriões excedentes torna-se evidente, pois possibilita uma logística economicamente viável para o sistema agropecuário, fazendo com que a transferência embrionária possa ser realizada em momento mais adequado, de acordo com as condições da propriedade. Além do impacto no setor produtivo, a criopreservação é indispensável para o comércio internacional de embriões e na conservação de raças e espécies ameaçadas de extinção.

Entretanto, os altos níveis de espécies reativas de oxigênio (do inglês — *reactive oxygen species* — ROS) produzidos no sistema de cultivo *in vitro* induzem um estresse oxidativo intracelular, responsáveis por causar injúrias moleculares e afetar a criotolerância em embriões PIVE (RIZOS et al. 2002, LI et al. 2016, BOMFIM et al. 2017, ANDRADE et al. 2019). Com isso, para garantir um desenvolvimento embrionário adequado, um equilíbrio entre a geração e a eliminação de ROS, fundamentais na transdução de sinais intracelulares (responsáveis pelo controle do ciclo celular, diferenciação e apoptose), deve ser mantido (JONES e SIES 2015, SIES 2017). Enquanto baixos níveis de ROS, produzidos *in vivo* por gametas e embriões, são necessários para a fecundação e o desenvolvimento inicial (HARVEY et al. 2002, SUNDERAM et al. 2014), altas concentrações têm sido associadas a uma diminuição da viabilidade embrionária, por induzir danos às biomoléculas (oxidação de carboidratos e

proteínas, fragmentação de ácidos nucleicos, peroxidação de lipídeos) e apoptose dos blastômeros (LEVY et al. 2001, LIU et al. 2003, NAVARRO et al. 2006).

Durante o desenvolvimento embrionário inicial, o ambiente tubárico fornece nutrientes, hormônios e fatores de crescimento até a chegada do embrião na luz uterina (HANNAN et al. 2011, THOUAS et al. 2015). Esse cenário é muito diferente do ambiente de cultivo *in vitro*, uma vez que a concentração atmosférica de oxigênio usada (20%), a exposição excessiva dos gametas à luz, a ausência de enzimas antioxidantes do trato genital, a utilização de excessivos volumes de meios de cultivo, além da natureza estática do embrião durante o cultivo, promovem um acúmulo de ROS e toxinas no meio de cultivo, os quais afetam a qualidade e a criotolerância dos embriões produzidos *in vitro* (SMITH e MONTEIRO DA ROCHA 2012, CASTILLO-MARTIN et al. 2014, WALE e GARDNER 2016).

Por esse motivo, a suplementação de compostos antioxidantes durante a PIVE é de suma importância, uma vez que controla a produção excessiva de ROS, além de melhorar a qualidade de embriões. De fato, estudos têm mostrado que a suplementação do meio de maturação e/ou meio de cultivo embrionário com compostos antioxidantes, tais como a cisteína, cisteamina, β -mercaptoetanol e cistina, é capaz de promover um incremento nas taxas e na qualidade embrionária (TAKAHASHI et al. 1993, DE MATOS e FURNUS 2000, DE MATOS et al. 2002, DE MATOS et al. 2002, FIDELIS 2014). No entanto, nem todas as concentrações e nem todos os tipos desses compostos tióis demonstraram efeitos benéficos na PIVE em diferentes espécies (DE MATOS et al. 2002, SONGSASEN e APIMETEETUMRONG 2002, MERLO et al. 2016). Logo, a demanda por antioxidantes mais eficientes, estáveis, com propriedades relativamente seguras e não tóxicas é crescente entre os grupos de pesquisa.

Os compostos fenólicos, oriundos do metabolismo secundário de plantas, possuem características antioxidantes já comprovadas, além de outras propriedades medicinais, como anti-inflamatórios naturais, antibióticos e antifúngicos (COSTA et al. 2000, AMARAL et al. 2014, CORREIA et al. 2016, BAPTISTA et al. 2018). O resveratrol, a icarina, a quercetina, a antocianina, são compostos fenólicos já testados na produção *in vitro* de embriões de mamíferos que resultaram em um incremento na qualidade embrionária (SAKATANI et al. 2007, YOU et al. 2010, KWAK et al. 2012, MUKHERJEE et al. 2014, ABE et al. 2017, SOVERNIGO et al. 2017, SPRICIGO et al. 2017, YE et al. 2017, HAYASHI et al. 2018, MADRID GAVIRIA et al. 2019). Isso sugere que os extratos de plantas podem ser mais uma alternativa para melhorar resultados da PIVE, não só devido a suas atividades antioxidantes,

mas porque também podem ter outras propriedades, além do controle do estresse oxidativo, as quais podem ser benéficas aos embriões.

Nesse contexto, o cerrado brasileiro, que é o segundo maior bioma da América do sul e a savana mais rica do mundo no que se refere a diversidade biológica, torna-se uma fonte potencial para a obtenção de compostos antioxidantes naturais. As plantas adaptadas ao solo e às condições climáticas adversas (com intensas queimadas) podem ter desenvolvido mecanismos moleculares eficientes de defesa contra ROS em seu processo de evolução, os quais envolvem a produção de potentes compostos antioxidantes, dentre outros compostos bioativos, já relatados por vários pesquisadores (SIQUEIRA et al. 2013, AMARAL et al. 2014, TAKAO et al. 2015, BAPTISTA et al. 2018).

Considerando o grande potencial antioxidante das plantas do bioma cerrado e a necessidade de testar novos compostos no controle do estresse oxidativo na rotina da PIVE bovina, o presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito da suplementação do meio de cultivo com extratos etanólicos de plantas do cerrado na qualidade e criotolerância de embriões bovinos.

1.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da suplementação de extratos etanólicos de plantas do cerrado no meio de cultivo *in vitro* na qualidade de embriões bovinos.

1.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante dos extratos etanólicos de folhas secas de plantas do cerrado
- b) Determinar a concentração mais adequada dos extratos a ser utilizada no cultivo embrionário para melhorar a produção e qualidade de embriões.
- c) Avaliar o efeito dos extratos etanólicos adicionados ao meio de cultivo nos níveis intracelulares de ROS e GSH de blastocistos bovinos.
- d) Avaliar o efeito dos extratos etanólicos nos níveis de transcritos de genes relacionados à apoptose (BAX, BCL2L1, CASP3 e CASP8) e ao metabolismo de ROS (SOD2, CAT, GPX4 e PRDX3).
- e) Avaliar o efeito da suplementação dos extratos de plantas do cerrado, durante o cultivo embrionário, na criotolerância de blastocistos bovinos.

2. REVISAO DE LITERATURA

2.1 Fatores que afetam a produção *in vitro* de embriões.

Gametas e embriões, quando manipulados para uso em técnicas de reprodução assistida (TRA), estão mais sujeitos ao estresse oxidativo. Isso ocorre pela insuficiência dos mecanismos celulares de defesa (antioxidantes endógenos), ou por exposição a diversos fatores indutores de ROS inerentes ao processo de cultivo celular (HALLIWELL 2014), tais como a concentração de O₂ na estufa, manipulação sob luz, composição dos meios de cultivo (AGARWAL et al. 2006).

Pabon e colaboradores (1989) já relatavam, há quase 30 anos, os prejuízos causados pela tensão atmosférica de oxigênio (20%) no ambiente de cultivo embrionário de murinos. Além disso, Wale e Gardner (2010) também mostraram que a alta tensão de O₂ causa um atraso na clivagem de embriões humanos cultivados e compromete o perfil de expressão gênica (RINAUDO e SCHULTZ 2004, CORREA et al. 2008) e o metabolismo embrionário (HALLIWELL e ARUOMA 1991, UMAOKA et al. 1992, JOHNSON e NASR-ESFAHANI 1994, ORSI e LEESE 2001, ALI et al. 2003, KITAGAWA et al. 2004, WALE e GARDNER 2012).

A exposição de ovócitos, sêmen e embriões à luz (da lupa ou do ambiente laboratorial) é inevitável nesses tipos de procedimentos. E isso pode ser deletério para o desenvolvimento embrionário. O binômio tempo e intensidade de exposição à luz é fundamental para atenuar ou agravar tais efeitos nocivos. Sabe-se que a luz azul (400 a 500nm), por exemplo, pode induzir a formação de peróxido de hidrogênio e alterar o funcionamento das enzimas da cadeia respiratória, além de aumentar a taxa de apoptose e a geração de ROS (OH et al. 2007), assim como o tempo de exposição à luz compromete a qualidade embrionária (UMAOKA et al. 1992, TAKENAKA et al. 2007, WALE e GARDNER 2016).

Outro ponto agravante na produção de ROS na PIVE está intimamente ligado à composição do meio de cultivo dos gametas e embriões (SMITH e MONTEIRO DA ROCHA 2012). As células, em geral, precisam de íons metálicos, especialmente o ferro e o cobre. Grande

parte dos reagentes usados na confecção dos meios contém concentrações de íons inorgânicos muito acima do necessário (FIRTH e GIESEG 2007, HALLIWELL 2014). Isso acelera a reação de Haber-Weiss, a reação de Fenton e produz, como consequência, o radical hidroxil. Quando adicionados ao meio de cultivo, esses íons metálicos aumentam os níveis de peróxido de hidrogênio e afetam, invariavelmente, o desenvolvimento embrionário inicial (NASR-ESFAHANI et al. 1990).

2.2 – Produção de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo

Qualquer tipo de átomo, molécula ou fragmento de molécula que possui pelo menos um elétron não compartilhado na camada de valência é considerado um radical livre ou espécie reativa. As espécies reativas de enxofre, carbono, nitrogênio e oxigênio (O_2) são as mais comuns. Dentre elas, a espécie reativa de oxigênio é considerada uma das mais relevantes. Isso deve-se ao fato dessas espécies reativas serem produzidas durante a etapa final da cadeia transportadora de elétrons (CTE), que ocorre na mitocôndria, para formação de ATP (DORMANDY 1980, AGARWAL e ALLAMANENI 2004).

O oxigênio pode ser considerado um radical livre por definição, já que possui dois elétrons desemparelhados, cada um localizado em um orbital, o que lhe confere uma alta reatividade (EVANS e HALLIWELL 1999). O O_2 , considerada a molécula mais abundante presente nos sistemas biológicos, pode sofrer adição de um elétron na mitocôndria e formar o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), a forma primária de ROS (GUTTERIDGE e HALLIWELL 2000). Além do oxigênio, outras formas de espécies reativas podem ser geradas, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2); o radical hidroxil ($\cdot OH$) e, em alguns casos, peróxidos de nitrogênio (NO_x). Essas variantes possuem, apesar de destinos distintos, a mitocôndria envolvida em parte da sua produção (MENEZO et al. 2016). O ânion superóxido, por exemplo, é gerado continuamente por diversos processos celulares durante a CTE ou por redução monoelétrica de O_2 , o qual desaparece rapidamente, em solução aquosa, pelo processo de dismutação (catalisada pela enzima superóxido dismutase – SOD) (HALLIWELL 1996). O produto dessa reação é o H_2O_2 , um fraco agente redutor, que possui habilidade em iniciar reações radiculares, além de causar peroxidações lipídicas. Em presença de metal de transição (Fe^{3+} , por exemplo), o peróxido de hidrogênio pode gerar o radical hidroxil, por meio da reação de Fenton [$H_2O_2 + Fe^{+2} \rightarrow Fe^{+3} + OH^- + \cdot OH$ (BEYER 1992, RAHA et al. 2000)]. Esse radical é considerado o mais reativo e mais lesivo e, para o qual, uma vez formado, não há mecanismos de defesa celular eficientes.

As espécies reativas, quando presentes em baixas concentrações, possuem função sinalizadora de etapas do processo de ovulação (SHKOLNIK et al. 2011), formação e funcionamento do corpo lúteo (VU et al. 2012), além de ser crucial no processo de capacitação espermática, fecundação e desenvolvimento embrionário inicial (HARVEY et al. 2002, SUNDERAM et al. 2014). Entretanto, quando sua produção é excessiva, a maquinaria celular dispõe de um eficiente sistema antioxidante, o qual consegue controlar e reestabelecer o equilíbrio. Caso essa homeostasia do *status redox* não ocorra, o estresse oxidativo — resultante do desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidante, é iniciado. Tal estresse pode ocasionar danos às biomoléculas, como proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos (LIU et al. 2003) e induzir a apoptose em diversos tipos celulares, além de alterações no desenvolvimento embrionário (LEVY et al. 2001, NAVARRO et al. 2006). Os principais alvos de ação dos radicais livres são:

- Carboidratos: O radical hidroxil, principalmente, faz uma abstração aleatória de um átomo de H⁺ de um dos átomos de carbono e, como consequência, ocorre uma oxidação da molécula.

- Ácidos nucleicos: As espécies reativas, como [•]OH, reagem com o carbono 4' ou 5' da desoxirribose e/ ou com as bases purínicas e pirimidínicas dos nucleotídeos. Há uma predileção com a guanina. O resultado dessa interação é a quebra da fita de DNA, com possíveis ligações cruzadas entre as bases nitrogenadas, o que leva a prováveis mutações e apoptose (MENEZO et al. 2016).

- Proteínas: Por possuir muitos sítios reativos, a extração do H⁺ do carbono α induz uma fragmentação das cadeias e, conseqüentemente, uma oxidação de quase todos os tipos de aminoácidos (mais frequentemente em prolina, arginina e lisina). Adicionalmente, proteínas podem conter sítios de ligação com metais, que são passíveis de oxidação/redução. Essas reações podem ativar proteases celulares, e, conseqüentemente, induzir proteólise.

- Lipídeos: A peroxidação lipídica ocorre, geralmente, pelo ataque do radical hidroxil, o qual retira um átomo de hidrogênio, deixando um elétron desemparelhado no carbono. Essas oxidações modificam as propriedades físico/químicas das membranas plasmáticas e alteram sua fluidez e permeabilidade (HALLIWELL 1996).

No intuito de manter os níveis fisiológicos de ROS e prevenir o estresse oxidativo, o excesso dessas espécies reativas deve ser constantemente neutralizado. Para isso, um sistema antioxidante celular é acionado (SMITH e MONTEIRO DA ROCHA 2012).

2.3 – Sistemas antioxidantes

Os antioxidantes são definidos como moléculas que, quando em baixas concentrações, são capazes de inibir a oxidação de outras moléculas. Dentro desse grupo, encontram-se algumas enzimas, aminoácidos, vitaminas, substratos energéticos e compostos tíóis, os quais agem por diferentes mecanismos: quelantes, sequestradores de ROS ou redutores (GUTTERIDGE e HALLIWELL 2000). Eles compõem, de maneira complexa, um eficiente sistema de defesa, os quais podem ser classificados em sistemas de defesa enzimáticos e não enzimáticos, responsáveis por reciclar ou sintetizar substratos para as defesas enzimáticas ou ainda, podem servir como substrato oxidável para as espécies reativas (HALLIWELL e GUTTERIDGE 2015).

Antioxidantes enzimáticos

Os componentes do sistema antioxidante enzimático possuem um papel chave na prevenção dos danos oxidativos causados pelas espécies reativas de oxigênio. As enzimas interceptam os ROS antes que elas cheguem ao alvo. Fazem parte dessa categoria as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) e peroxiredoxina (PRDX) (HALLIWELL e GUTTERIDGE 2015, KHAZAEI e AGHAZ 2017).

No que se refere a SOD, quatro classes já foram descritas: Mn-SOD, localizada na mitocôndria; Cu-SOD e Zn-SOD, localizadas no citosol, lisossomos, núcleo e mitocôndria (membrana interna e externa) e SOD extracelular. Sua função consiste em dismutar o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), considerado um dos mais abundantes ROS existentes na célula (HALLIWELL et al. 1992, GUTTERIDGE e HALLIWELL 2000, RAHA et al. 2000). Essa espécie reativa de oxigênio (H_2O_2) é neutralizada pela CAT e pela GPX (Figura 1).

A catalase, encontrada apenas nos peroxissomos, é uma das mais eficientes enzimas conhecidas e não sofre qualquer influência na sua atividade em decorrência da concentração de H_2O_2 (MICHIELS et al. 1994, LLEDIAS et al. 1998). Entretanto, atua apenas contra o peróxido de hidrogênio (Figura 1).

A glutathione peroxidase, por sua vez, possui um espectro de atuação mais amplo, pois além de agir no H_2O_2 , atua na redução de hidroperóxidos lipídicos, convertendo-os em H_2O (LIMAYE et al. 2003). Ela possui 4 formas e locais distintos: GPX 1 ou clássica, localizada no citoplasma; GPX 2 ou gastrointestinal; GPX3 ou plasmática, encontrada no plasma sanguíneo; e GPX4, encontrada no citoplasma. Essas enzimas atuam sobre os peróxidos de

resíduos de ácidos graxos nas membranas e lipoproteínas, e reduzem o hidroperóxido da timina, resultante do ataque de ROS à base timina do DNA (RAYMAN 2000).

As peroxiredoxinas (PRDXs) constituem uma família de peroxidases muito eficientes, que reduzem os peróxidos a partir do resíduo de cisteína em sua estrutura (CHAE et al. 1999, WOO et al. 2010). Atualmente, seis isoformas de peroxiredoxinas (PRDX 1 a 6) foram isoladas e divididas em três subgrupos (2-Cys, 2-Cys atípica e 1-Cys). Formam, juntamente com as tioredoxinas (TRX), umas das primeiras linhas de defesa contra o H₂O₂ produzido na cadeia respiratória mitocondrial (SPYROU et al. 1997). Os 2 resíduos de cisteínas presentes em sua estrutura molecular dimérica (uma cisteína em cada monômero) servem como local primário de oxidação dos peróxidos. Como processo final dessa reação, dissulfetos são gerados, os quais poderão ser reduzidos pela TRX (WOOD et al. 2003), glutathione redutase ou NADPH para a sua forma original. Além de sua atividade de peroxidase, os membros da subfamília 2-Cys atuam como sensores de peróxido para outras proteínas. A hiperoxidação da 2-Cys peroxiredoxina — oriunda da oxidação dos dois resíduos de cisteína — resulta em uma transição do dímero para um decâmero, o qual pode sofrer agregação com outros decâmeros. Essas formas decaméricas e agregadas ganham função de proteína chaperona (JANG et al. 2004). Esse equilíbrio de dímeros, decâmeros e complexos de alto peso molecular depende do estado redox da cisteína catalítica. A hiperoxidação favorece a formação de complexos de alto peso molecular — as quais exibem uma atividade de chaperona. Já a redução da enzima leva a uma reativação da atividade de peroxidase e suprime, concomitantemente, a atividade de chaperona ao mudar o equilíbrio em favor dos dímeros (RHEE e WOO 2011). Esse grupo enzimático possui, portanto, duas funções: de peroxidase (quanto em forma de dímeros) e de chaperona (em forma de decâmeros).

Antioxidantes não enzimáticos

Essa classe engloba compostos não enzimáticos — geralmente pequenas moléculas — com função antioxidante, tais como compostos tióis (glutathione, cisteamina), aminoácidos (taurina e hipotaurina), vitaminas como α -tocoferol, ácido ascórbico (GUTTERIDGE e HALLIWELL 2000, HALLIWELL e GUTTERIDGE 2015), além de substratos energéticos, como o piruvato (SMITH e MONTEIRO DA ROCHA 2012).

A glutathione, um tripeptídeo tiol (γ -glutamil-*L*-cisteinilglicina), é o maior composto sulfídrico não proteico presente nas células de mamíferos. Detém um papel chave como cofator na família das peroxidases. Ainda, a GSH está envolvida no metabolismo do ácido

ascórbico, comunicação intercelular, transporte intracelular de cobre, além de prevenir proteínas com grupo -SH da oxidação. A glutathiona pode quelar íons de cobre e diminuir sua habilidade em gerar ROS. Participa na detoxificação de compostos exógenos e endógenos, mantendo o estado redox intracelular (LUBERDA 2005). A capacidade redutora da glutathiona confere uma ação protetora contra danos oriundos do estresse oxidativo. A glutathiona é encontrada em duas formas: a forma reduzida (GSH) e a forma oxidada (GSSG). O mecanismo de oxirredução ocorre na presença das enzimas glutathiona peroxidase (1) e/ou glutathiona redutase (2), conforme demonstrado a seguir.



A cisteamina atua na redução do radical hidroxil além de ajudar, em partes, na conversão da glutathiona oxidada (GSSG) para glutathiona reduzida (efeito similar ao da glutathiona redutase). Outra função antioxidante indireta da cisteamina consiste em aumentar os níveis de glutathiona, pois possibilita uma maior disponibilidade do aminoácido cisteína, precursor desse tiol (ISHII et al. 1981, RATHBUN e MURRAY 1991). Ao ser oxidada pelo radical hidroxila, a cisteamina é convertida em hipotaurina (Figura 1), que por sua vez reage com espécies reativas de oxigênio, neutralizando-as. Em decorrência dessa reação, a hipotaurina rapidamente se torna taurina, a qual possui a função de interação com alguns aldeídos (citotóxicos) oriundos da oxidação lipídica causadas pelo ROS.

O ácido ascórbico (vitamina C) possui uma alta atividade antioxidante, assim como o α -tocoferol (vitamina E). Quando suplementados em cultivo embrionário *in vitro* de diversas espécies de mamíferos, as taxas de embriões aumentaram e os danos no DNA reduziram de maneira significativa (OLSON e SEIDEL 2000, KITAGAWA et al. 2004, NATARAJAN et al. 2010).

O piruvato, oriundo da glicólise, além de ser fonte de produção de ATP, atua como agente antioxidante. Na presença de peróxido de hidrogênio, o piruvato é descarboxilado para produzir acetato, dióxido de carbono e água. Ainda, o piruvato, quando suplementado em meios de cultivo celular, é capaz de proteger a célula contra apoptose (SMITH e MONTEIRO DA ROCHA 2012).

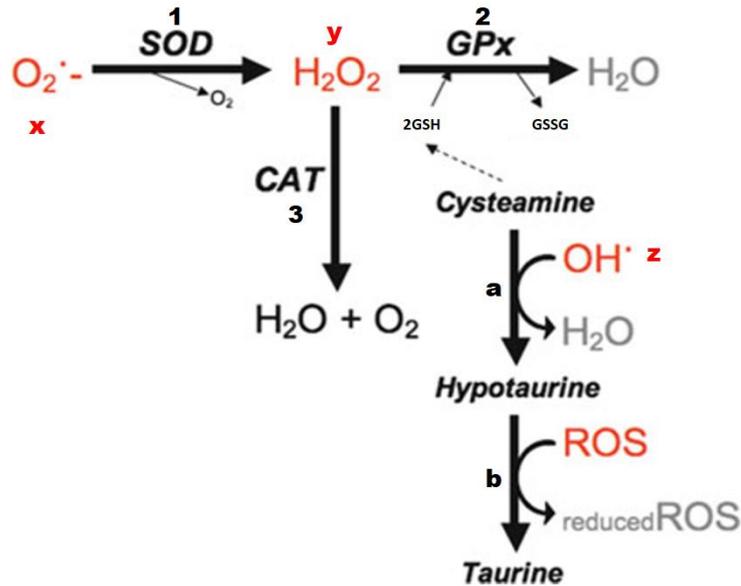


Figura 1: Mecanismo de neutralização das espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos sistemas enzimáticos e não enzimáticos. Há uma rede de interações entre o sistema antioxidante enzimático, pelas enzimas superóxido dismutase (1), glutathione peroxidase (2) e catalase (3), com intuito de reduzir ou neutralizar as espécies reativas de oxigênio oriundas do metabolismo celular, como o ânion superóxido (x), peróxido de hidrogênio (y) e radical hidroxila (z). Esse último é neutralizado pela ação de antioxidantes não enzimáticos, como a cisteamina, que após ser oxidada pelo radical hidroxil (z), é convertida em hipotaurina (a) e, logo em seguida é convertida em taurina (b), cuja função é eliminar alguns metabólitos (aldeídos) oriundos da oxidação lipídica causada pelos ROS. Fonte: Adaptado de (SMITH e MONTEIRO DA ROCHA 2012).

Os agentes queladores ou quelantes são moléculas com pelo menos dois grupos carregados negativamente, os quais lhes permitem formar complexos, ou quelatos, com íons metálicos que possuem múltiplas cargas positivas. Os grupos carregados negativamente, normalmente contendo oxigênio, enxofre ou nitrogênio, estão dispostos de maneira espaçada ao longo da molécula, o que permite a formação de um anel com pelo menos uma ligação covalente entre o quelante e o íon (LINDENBAUM 1973). Os anéis mais estáveis são aqueles que possuem entre 5 e 7 ligações, ou pontos de contato. Essa configuração geométrica remete a uma garra (*chele*, em grego), que deu origem a palavra quelante.

Os quelantes são fundamentais dentro da maquinaria celular para impedir a propagação de ROS, pois sequestram os íons metálicos e, com isso, impedem a participação deles na reação de Fenton (Figura 2), cruciais para a formação do radical hidroxil.

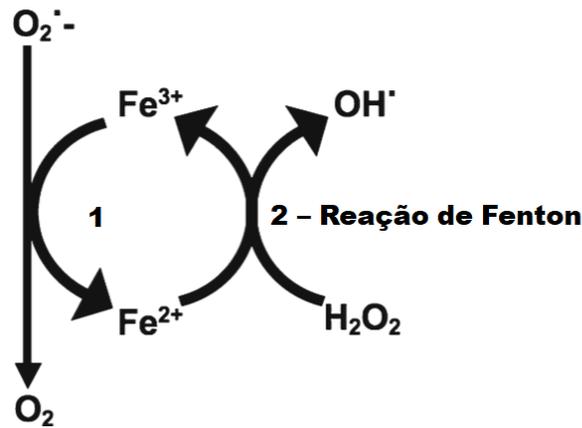


Figura 2:Reação de Fenton.

A reação de Fenton forma radicais hidroxil a partir do peróxido de hidrogênio e metal. Essas reações são catalisadas pelos íons ferroso (Fe^{2+}) e férrico (Fe^{3+}). O primeiro passo da reação (1) é a redução do íon Fe^{3+} para Fe^{2+} pela superóxido. Assim, o oxigênio é gerado. A reação de Fenton (2) é a segunda etapa, cujo o H_2O_2 é convertido em radical hidroxila, ao passo que o íon ferroso é oxidado em íon férrico. Fonte: Adaptado de (SMITH e MONTEIRO DA ROCHA 2012).

Os antioxidantes com atividade enzimática e não enzimática estão presentes, naturalmente, no aparelho reprodutivo feminino dos mamíferos (útero, tuba uterina) e nos embriões. Há relatos de transcritos das enzimas SOD, GPX, CAT tuba uterina de bovinos, suínos, humanos, camundongos e coelhos (NODA et al. 1991, LAPOINTE et al. 1998, LAPOINTE e BILODEAU 2003). Além disso, os antioxidantes não enzimáticos como a glutathiona, cisteamina, hipotaurina e taurina também já foram isolados de fluido folicular, útero e tuba uterina (CASSLEN 1987, GUERIN et al. 1995). Adicionalmente a todos esses mecanismos eficientes de combate ao excesso de ROS, a concentração de O_2 no ambiente tubárico é de, aproximadamente, 2 a 6% (PABON et al. 1989, FISCHER e BAVISTER 1993). Dessa forma, a propensão para produção de espécies reativas no local de desenvolvimento embrionário nos mamíferos tende a ser mais baixa quando comparada ao ambiente laboratorial (AGARWAL e ALLAMANENI 2004).

Considerando que no ambiente *in vitro* muitas dessas defesas podem não estar presentes, ou serem insuficientes para lidar com o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, o uso de moléculas antioxidantes para melhoria de processo, torna-se imprescindível. Várias pesquisas com foco em diferentes fontes de antioxidantes exógenos, como medidas paliativas para incrementar a taxa e a qualidade embrionária, têm sido realizadas.

2.4 Uso de antioxidantes na produção *in vitro* de embriões.

Com o intuito de minimizar os efeitos do estresse oxidativo e mimetizar o ambiente fisiológico, a adição de compostos antioxidantes no sistema de produção de embriões

tem se tornado uma rotina. Diversos deles, encontrados no trato reprodutivo e em fluidos seminais, são utilizados nos meios de maturação ou cultivo embrionário e tem demonstrado melhorias nas taxas e na qualidade embrionária (AGARWAL et al. 2014). Os compostos são variados e abrangem desde antioxidantes endógenos, tais como a taurina, hipotaurina, L-carnitina, hormônios (melatonina), vitaminas (ácido ascórbico), compostos tióis — como a glutatona e cisteamina (SMITH e MONTEIRO DA ROCHA 2012), até compostos naturais, obtidos de plantas medicinais, como os compostos fenólicos (WANG et al. 2007, WANG et al. 2007, YU et al. 2014).

A taurina é rotineiramente utilizada nos meios de cultivo embrionário de mamíferos. Ela propicia um aumento no número de células embrionárias em camundongos e coelhos (DUMOULIN et al. 1992, LI et al. 1993), além de contribuir com o equilíbrio osmótico dos embriões (DUMOULIN et al. 1997). A hipotaurina pode ser sintetizada a partir da cisteína e atua como sequestrador (*scavenger*) durante o cultivo embrionário *in vitro*, promovendo uma melhoria nas taxas de blastocistos bovinos (GUERIN et al. 1995).

A L-carnitina previne os prejuízos da beta-oxidação ocorridos na mitocôndria, repara as oxidações lipídicas na membrana plasmática (DUNNING e ROBKER 2012), além de reduzir apoptose (DOKMECI 2005), os níveis de ROS e aumentar as concentrações de GSH (MISHRA et al. 2016). Quando adicionados ao meio de cultivo de embriões murinos, Abdelrazik et al (2009) relataram um significativo decréscimo nos danos causados no DNA.

Diversos meios de cultivo adicionam vitaminas em seu preparo, de maneira individual ou uma mistura delas. A vitamina E (α – tocoferol) é um potente antioxidante usado no cultivo embrionário, pois promove melhorias na taxa de clivagem, mórula e blastocisto (GUIMARAES et al. 2016). O seu efeito é maior em sistemas de cultivo com alta tensão de O₂ (20%) do que em baixa tensão (5%) (NATARAJAN et al. 2010)

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um hormônio produzido pela glândula pineal e possui um importante papel no controle de espécies reativas de oxigênio, pois sequestra esses derivados tóxicos. Também modula a expressão gênica de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (MEHAISEN et al. 2015). Em contraste a outros antioxidantes, a melatonina não participa de outros ciclos de oxirredução, pois, uma vez oxidada, ela gera produtos estáveis, incapazes de participar, novamente, de tais processos redox (RODRIGUES-CUNHA et al. 2016). Ainda assim, seu uso tem propiciado importantes acréscimos na qualidade dos blastocistos produzidos *in vitro* (CRUZ et al. 2014, MARQUES et al. 2018).

O uso de moléculas precursoras de glutathiona, como a cistina, cisteína, β -mercaptoetanol, também promovem um incremento nas taxas e qualidade embrionária, seja adicionado ao meio de maturação e/ou meio de cultivo (TAKAHASHI et al. 1993, CAAMANO et al. 1996, DE MATOS e FURNUS 2000, DE MATOS et al. 2002, TAKAHASHI et al. 2002, HOSSEINI et al. 2009).

2.4.1 – Uso de compostos fenólicos como antioxidante

Um instigante fenômeno intitulado como “o paradoxo francês”, por Renaud e De Lorgeril em 1992, induziu um interesse global nos potenciais efeitos benéficos oriundos dos compostos fenólicos. Tal paradoxo referia-se a baixa incidência de doenças coronárias nos franceses, conhecidos pela alimentação bastante gordurosa e pelo consumo de tabaco. A alta ingestão de vinho, rico em polifenóis, foi uma das explicações para tal episódio. De fato, sabe-se que esses metabólitos secundários de plantas (compostos fenólicos), de alguma maneira, diminuem os riscos dessas doenças (RENAUD e DE LORGERIL 1992).

Os compostos fenólicos são encontrados em diversas plantas e frutos, como uva, azeitona, brócolis, café, chá, vinho, grão e cereais em geral. São responsáveis, muitas vezes, em conferir as cores atrativas das folhas, frutos e flores (LEOPOLDINI 2011). Com aproximadamente 8.000 já identificados, os compostos fenólicos possuem uma característica estrutural em comum: o fenol (um anel aromático com pelo menos um grupo hidroxila). Esses compostos abrangem desde moléculas mais simples, com apenas um fenol (como ácidos fenólicos), a compostos polimerizados (polifenóis) complexos, como os taninos. São subdivididos em quatro grupos:

- Ácidos fenólicos, como o ácido clorogênico, presente no café;
- Estilbenos, como o resveratrol, presente nas uvas e vinho;
- Ligninas, como as lignanas encontradas na linhaça;
- Flavonoides, como as antocianinas, encontradas em frutas vermelhas.

Os flavonoides compõem o maior grupo de baixo peso molecular, estratificado em diversas subclasses: flavononas, isoflavonas, flavanóis (catequinas, quercetina, miracetina), flavonas (apegenina, lutelolina, diosmetina), flavonóis e antocianinas (BRAVO 1998), de acordo como grau de insaturações e oxidações do carbono (Figura 3). O forte poder antioxidante dos flavonoides é umas das propriedades mais documentadas (HANASAKI et al. 1994, BURDA e OLESZEK 2001). Sua estrutura molecular é ideal para tal atividade, pois confere uma alta capacidade em doar átomos de hidrogênio ou transferir elétrons. Os flavonoides

possuem, ainda, uma atividade quelante de íons metálicos e isso impede, portanto, a formação de radicais livres (LEOPOLDINI et al. 2006).

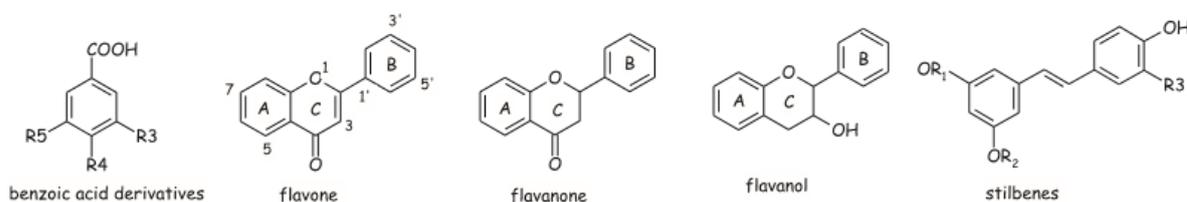


Figura 3: Esqueleto molecular do ácido benzoico (fenol simples) e de polifenóis (flavonoides e estilbeno). Adaptado de (LEOPOLDINI 2011).

Há, na literatura, relatos de produção de compostos antioxidantes em diversas plantas típicas do cerrado. Em um estudo recente, Siqueira e colaboradores (2013) mensuraram a quantidade de compostos bioativos (polifenóis, vitamina C e carotenoides) de frutos de 12 exemplares desse bioma: araticum (*Annona crassiflora*), baru (*Dipteryx alata*), cagaita (*Eugenia dysenterica*), cajuzinho (*Anacardium humile*), guariroba (*Syagrus oleracea*), ingá (*Inga laurina*), jatobá (*Hymenaea stigonocarpa*), jenipapo (*Genipa americana*), jurubeba (*Solanum paniculatum*), lobeira (*Solanum grandiflorum*), mangaba (*Hancornia speciosa*) e tucum (*Bactris setosa*). A quantidade de flavonoides, antocianinas, vitamina C e carotenoides foi maior nessas plantas em relação à maçã verde. A cagaita, por exemplo, possuía 4,4 vezes mais polifenóis do que a maçã verde. Além disso, os autores observaram que, para algumas plantas, o teor desse composto fenólico também foi maior do que exemplares de plantas obtidas do nordeste brasileiro. A grande quantidade de compostos fenólicos, presente em determinada amostra de planta, está correlacionada com a sua atividade antioxidante (TAKAO et al. 2015). Diante disso, a utilização de extratos obtidos de plantas do cerrado, como agentes antioxidantes, em tecnologias de reprodução assistida pode vir a ser uma alternativa interessante no combate às adversidades geradas no processo.

2.4.2 – Compostos fenólicos utilizados na produção *in vitro* de embriões.

A quercetina, flavonoide presente na dieta humana, é encontrada em altas concentrações no brócolis, maçã, cebola, repolho, dentre outros. Ao adicioná-la no meio de maturação de ovócitos de bovinos, na concentração de 2 μ M, Sovernigo *et al.*, (2017) obtiveram uma redução significativa na produção de ROS. A vitamina C, na concentração de 50 μ g/mL, nesse mesmo trabalho, também diminuiu a produção de ROS. Kang *et al.*, (2013) constataram significativos decréscimos nos níveis de ROS em embriões suínos cultivados *in vitro* com a adição de quercetina (1 μ g/mL).

O resveratrol, composto fenólico da classe dos estilbenos, é encontrado em uvas e vinhos. Kwak et al (2012), ao usá-lo numa concentração de $2\mu\text{M}$, em ovócitos de suínos, relatam uma relativa diminuição na produção de ROS, assim como um incremento na síntese de GSH e um aumento nas taxas de blastocisto e no número de células embrionárias. Sovernigo et al (2017), ao usar a mesma concentração de resveratrol na maturação ovocitária, obtiveram decréscimos nos níveis intracelulares de ROS em embriões de bovinos.

You et al (2010), ao utilizarem $0,1\mu\text{g/mL}$ de antocianina no meio de maturação de ovócitos de suínos, aumentaram as taxas de blastocistos oriundos de transferência nuclear em 16%, além de reduzirem a produção de ROS. A icarina, flavonoide encontrado nas folhas de *Epimedium brevicornum* (planta natural da Ásia), em uma concentração de $40\mu\text{M}$, diminuiu a produção de ROS e aumentou a taxa de blastocisto, quando adicionada ao meio de cultivo embrionário de camundongos (YE et al. 2017).

Os compostos fenólicos do chá verde são os maiores componentes hidrossolúveis presentes na bebida, tais como a epicatequina, a epigallocatequina. Em uma concentração de $15\mu\text{M}$ de polifenóis do chá verde purificados, Wang e sua equipe (2007) mostraram melhorias na maturação ovocitária de bovinos, além de um aumento nos níveis intracelulares de glutathione. Essa mesma equipe, em um estudo *a posteriori*, constatou que além desses benefícios, os flavonoides do chá verde (adicionados na maturação e cultivo embrionário, numa concentração de $15\mu\text{M}$ — com 10% epicatequina e 50% de epigallocatequina) foram responsáveis por reduzir as taxas de apoptose e induzir aumento dos transcritos de enzimas pertencentes ao sistema celular antioxidante, como a SOD1, CAT e GPX, em células embrionárias de bovinos. Ainda, os embriões cultivados sob a presença desses compostos fenólicos resultaram em maiores taxas de gestação em bovinos (WANG et al. 2013).

A antocianina — composto fenólico responsável pela coloração roxa/avermelhada do açaí, framboesa, amora, cereja e jabuticaba — difere, em sua estrutura molecular, dos outros flavonoides, por conter um átomo de oxigênio em um dos anéis (LEOPOLDINI 2011). Em cultivo celular, Lazze e colaboradores (2003) descreveram um alto poder inibitório na produção de ROS causado pela antocianina. Já em cultivo embrionário de bovinos, Sakatani *et al.* (2007) encontraram achados similares aos de Lazze em relação ao decréscimo dos níveis de ROS e, ainda, citam um aumento de glutathione reduzida em embriões submetidos ao estresse térmico quando adicionaram no cultivo extrato de batata doce roxa (*Ipomoea batatas*), fonte desse composto fenólico. You et al (2010), ao utilizarem $0,1\mu\text{g/mL}$

de antocianina no meio de maturação de ovócitos de suínos, aumentaram as taxas de blastocistos oriundos de transferência nuclear em 10%, além de reduzirem a produção de ROS.

2.4.3 – Criopreservação de embriões PIV cultivados com compostos antioxidantes.

As condições de cultivo embrionário *in vitro* afetam a qualidade dos embriões produzida e, conseqüentemente, os deixam mais susceptíveis às injúrias oriundas do processo de criopreservação. Para produzir embriões mais criotolerantes, diferentes estratégias são utilizadas, incluindo a utilização de moléculas antioxidantes para minimizar os efeitos deletérios do cultivo em laboratório.

Alguns antioxidantes sintéticos como o β -mercaptoetanol, já foram utilizados com esse propósito. Entretanto, ainda há divergência na literatura sobre o seu real efeito protetor/tóxico (HOSSEINI et al. 2009, FIDELIS 2014). Por esse motivo, compostos antioxidantes naturais têm sido utilizados para o incremento da qualidade embrionária e resistência ao processo de criopreservação. Nesse contexto, compostos como o resveratrol, carotenoides (crocetina), melatonina, L-carnitina, quercetina, ácido ascórbico já foram adicionados aos meios de cultivo com o objetivo de melhorar a qualidade e criotolerância embrionária (TAKAHASHI et al. 2013, CASTILLO-MARTIN et al. 2014, SALZANO et al. 2014, WANG et al. 2014, MEHAISEN et al. 2015, ZULLO et al. 2016, ABE et al. 2017, HAYASHI et al. 2018, SARAIVA et al. 2018, MADRID GAVIRIA et al. 2019, ZOLINI et al. 2019).

No entanto, nem todos os compostos usados demonstraram os resultados esperados. O uso da L-carnitina, por exemplo, não alterou as taxas de re-expansão, eclosão e apoptose de embriões ovinos criopreservados (SARAIVA et al. 2018), assim como em blastocistos de bovinos, conforme descrito por Zolini et al (2019). Já os efeitos benéficos do resveratrol foram descritos na criopreservação de sêmen de búfalo (LONGOBARDI et al. 2017), ovócitos de suínos e bovinos (GIARETTA et al. 2013, SOVERNIGO et al. 2017, SPRICIGO et al. 2017), mas não em blastocistos criopreservados de bovinos, suplementados com esse polifenol durante o cultivo (MADRID GAVIRIA et al. 2019). A crocetina (polifenol encontrado no açafraão) em contrapartida, foi capaz de melhorar a criotolerância de embriões bovinos, quando acrescentada durante o cultivo (ZULLO et al. 2016).

As variações nos resultados de criotolerância deixam clara a necessidade de buscar alternativas para solucionar esse entrave, tais como compostos antioxidantes mais

estáveis, de baixa toxicidade e alto efeito protetor. Por essa razão, pesquisas com compostos naturais com alto poder antioxidante, oriundos do cerrado brasileiro, têm despertado grande interesse de grupos de pesquisas.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelrazik, H., R. Sharma, R. Mahfouz and A. Agarwal (2009). "L-carnitine decreases DNA damage and improves the *in vitro* blastocyst development rate in mouse embryos." Fertil Steril **91**(2): 589-596.

Agarwal, A. and S. S. Allamaneni (2004). "Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction." Reprod Biomed Online **9**(3): 338-347.

Agarwal, A., D. Durairajanayagam and S. S. du Plessis (2014). "Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review." Reprod Biol Endocrinol **12**: 112.

Agarwal, A., T. M. Said, M. A. Bedaiwy, J. Banerjee and J. G. Alvarez (2006). "Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting." Fertil Steril **86**(3): 503-512.

Ali, A. A., J. F. Bilodeau and M. A. Sirard (2003). "Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development." Theriogenology **59**(3-4): 939-949.

Andrade, G. M., M. M. Bomfim, M. Del Collado, F. V. Meirelles and F. Perecin (2019). "Oxygen tension modulates extracellular vesicles and its miRNA contents in bovine embryo culture medium." **86**(8): 1067-1080.

Arama, E. and H. Steller (2006). "Detection of apoptosis by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling and acridine orange in *Drosophila* embryos and adult male gonads." Nat Protoc **1**(4): 1725-1731.

Arts, I. C. and P. C. Hollman (2005). "Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies." Am J Clin Nutr **81**(1 Suppl): 317S-325S.

Baek, I. J., J. M. Yon, B. J. Lee, Y. W. Yun, W. J. Yu, J. T. Hong, B. Ahn, Y. B. Kim, D. J. Kim, J. K. Kang and S. Y. Nam (2005). "Expression pattern of cytosolic glutathione peroxidase (cGPx) mRNA during mouse embryogenesis." Anat Embryol (Berl) **209**(4): 315-321.

Bagis, H., T. Akkoc, C. Taskin and S. Arat (2010). "Comparison of different cryopreservation techniques: higher survival and implantation rate of frozen-thawed mouse pronuclear embryos in the presence of beta-mercaptoethanol in post-thaw culture." Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene **45**(6): e332-337.

Betts, D. H. and W. A. King (2001). "Genetic regulation of embryo death and senescence." Theriogenology **55**(1): 171-191.

Beyer, R. E. (1992). "An analysis of the role of coenzyme Q in free radical generation and as an antioxidant." Biochem Cell Biol **70**(6): 390-403.

- Bomfim, M. M., G. M. Andrade, M. Del Collado, J. R. Sangalli, P. K. Fontes, M. F. G. Nogueira, F. V. Meirelles and J. C. da Silveira (2017). "Antioxidant responses and deregulation of epigenetic writers and erasers link oxidative stress and DNA methylation in bovine blastocysts." 84(12): 1296-1305.
- Bravo, L. (1998). "Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance." Nutr Rev **56**(11): 317-333.
- Burda, S. and W. Oleszek (2001). "Antioxidant and antiradical activities of flavonoids." J Agric Food Chem **49**(6): 2774-2779.
- Caamano, J. N., Z. Y. Ryoo, J. A. Thomas and C. R. Youngs (1996). "beta-mercaptoethanol enhances blastocyst formation rate of bovine *in vitro*-matured/*in vitro*-fertilized embryos." Biology of reproduction **55**(5): 1179-1184.
- Casslen, B. G. (1987). "Free amino acids in human uterine fluid. Possible role of high taurine concentration." J Reprod Med **32**(3): 181-184.
- Cezarotto, V. S., S. R. Giacomelli, M. H. Vendruscolo, A. S. Vestena, C. S. Cezarotto, R. C. da Cruz, L. H. Maurer, L. M. Ferreira, T. Emanuelli and L. Cruz (2017). "Influence of Harvest Season and Cultivar on the Variation of Phenolic Compounds Composition and Antioxidant Properties in Vaccinium ashei Leaves." Molecules (Basel, Switzerland) **22**(10): 1603.
- Chae, H. Z., H. J. Kim, S. W. Kang and S. G. Rhee (1999). "Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin." Diabetes Res Clin Pract **45**(2-3): 101-112.
- Correa, G. A., R. Rumpf, T. C. Mundim, M. M. Franco and M. A. Dode (2008). "Oxygen tension during *in vitro* culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress." Animal reproduction science **104**(2-4): 132-142.
- Cruz, M. H., C. L. Leal, J. F. da Cruz, D. X. Tan and R. J. Reiter (2014). "Role of melatonin on production and preservation of gametes and embryos: a brief review." Anim Reprod Sci **145**(3-4): 150-160.
- de Matos, D. G. and C. C. Furnus (2000). "The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine *in vitro* maturation on embryo development effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine." Theriogenology **53**(3): 761-771.
- de Matos, D. G., C. Herrera, R. Cortvrindt, J. Smitz, A. Van Soom, D. Nogueira and R. S. Pasqualini (2002). "Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation and embryo culture: a useful tool for increasing the efficiency of bovine *in vitro* embryo production." Molecular reproduction and development **62**(2): 203-209.
- Do, G. Y., J. W. Kim, H. J. Park, S. B. Yoon, J. Y. Park, S. G. Yang, B. D. Jung, Y. S. Kwon, M. J. Kang, B. S. Song, S. U. Kim, K. T. Chang and D. B. Koo (2017). "Native plants (*Phellodendron amurense* and *Humulus japonicus*) extracts act as antioxidants to support developmental competence of bovine blastocysts." Asian-Australas J Anim Sci **30**(9): 1245-1252.
- Dokmeci, D. (2005). "Oxidative stress, male infertility and the role of carnitines." Folia Med (Plovdiv) **47**(1): 26-30.
- Dormandy, T. L. (1980). "Free-radical reaction in biological systems." Annals of the Royal College of Surgeons of England **62**(3): 188-194.
- Droge, W. (2002). "Free radicals in the physiological control of cell function." Physiol Rev **82**(1): 47-95.

- Dumoulin, J. C., J. L. Evers, J. A. Bakker, M. Bras, M. H. Pieters and J. P. Geraedts (1992). "Temporal effects of taurine on mouse preimplantation development *in vitro*." Hum Reprod **7**(3): 403-407.
- Dumoulin, J. C., L. C. van Wissen, P. P. Menheere, A. H. Michiels, J. P. Geraedts and J. L. Evers (1997). "Taurine acts as an osmolyte in human and mouse oocytes and embryos." Biol Reprod **56**(3): 739-744.
- Dunning, K. R. and R. L. Robker (2012). "Promoting lipid utilization with l-carnitine to improve oocyte quality." Anim Reprod Sci **134**(1-2): 69-75.
- Evans, P. and B. Halliwell (1999). "Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria." Annals of the New York Academy of Sciences **884**: 19-40.
- Fidelis, A. A. G.; Leme, L. ; Ramiro Jr., E. ; Leme, A. ; Rumpf, R ; Franco, M. M . (2014). "Antioxidantes associados à pressão hidrostática sobre a viabilidade embrionária pós desvitrificação." Revista Brasileira de Reprodução Animal **38**: 60-66.
- Firth, C. A. and S. P. Gieseg (2007). "Redistribution of metal ions to control low density lipoprotein oxidation in Ham's F10 medium." Free Radic Res **41**(10): 1109-1115.
- Fischer, B. and B. D. Bavister (1993). "Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits." Journal of reproduction and fertility **99**(2): 673-679.
- Guerin, P., J. Guillaud and Y. Menezo (1995). "Hypotaurine in spermatozoa and genital secretions and its production by oviduct epithelial cells *in vitro*." Hum Reprod **10**(4): 866-872.
- Guimaraes, A. L., S. A. Pereira, N. R. Kussano and M. A. Dode (2016). "The effect of pre-maturation culture using phosphodiesterase type 3 inhibitor and insulin, transferrin and selenium on nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes." Zygote **24**(2): 219-229.
- Gutteridge, J. M. and B. Halliwell (2000). "Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future." Ann N Y Acad Sci **899**: 136-147.
- Halliwell, B. (1996). "Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation." Biochem Soc Trans **24**(4): 1023-1027.
- Halliwell, B. (1996). "Mechanisms involved in the generation of free radicals." Pathol Biol (Paris) **44**(1): 6-13.
- Halliwell, B. (2014). "Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: avoiding pitfalls." Biomed J **37**(3): 99-105.
- Halliwell, B. and O. I. Aruoma (1991). "DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems." FEBS letters **281**(1-2): 9-19.
- Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (2015). Free radicals in biology and medicine, Clarendon Press.
- Halliwell, B., J. M. Gutteridge and C. E. Cross (1992). "Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?" J Lab Clin Med **119**(6): 598-620.
- Hanasaki, Y., S. Ogawa and S. Fukui (1994). "The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids." Free Radic Biol Med **16**(6): 845-850.
- Hardy, K., A. H. Handyside and R. M. Winston (1989). "The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development *in vitro*." Development **107**(3): 597-604.

- Harvey, A. J., K. L. Kind and J. G. Thompson (2002). "REDOX regulation of early embryo development." Reproduction **123**(4): 479-486.
- Higdon, J. V. and B. Frei (2003). "Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions." Crit Rev Food Sci Nutr **43**(1): 89-143.
- Holm, P. and H. Callesen (1998). "*In vivo* versus *in vitro* produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application." Reprod Nutr Dev **38**(6): 579-594.
- Hosseini, S. M., M. Forouzanfar, M. Hajian, V. Asgari, P. Abedi, L. Hosseini, S. Ostadhosseini, F. Moulavi, M. Safahani Langroodi, H. Sadeghi, H. Bahramian, S. Eghbalsaied and M. H. Nasr-Esfahani (2009). "Antioxidant supplementation of culture medium during embryo development and/or after vitrification-warming; which is the most important?" Journal of assisted reproduction and genetics **26**(6): 355-364.
- Imai, H. and Y. Nakagawa (2003). "Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells." Free Radic Biol Med **34**(2): 145-169.
- Ishii, T., S. Bannai and Y. Sugita (1981). "Mechanism of growth stimulation of L1210 cells by 2-mercaptoethanol *in vitro*. Role of the mixed disulfide of 2-mercaptoethanol and cysteine." The Journal of biological chemistry **256**(23): 12387-12392.
- Iwata, H., S. Akamatsu, N. Minami and M. Yamada (1998). "Effects of antioxidants on the development of bovine IVM/IVF embryos in various concentrations of glucose." Theriogenology **50**(3): 365-375.
- Jang, H. H., K. O. Lee, Y. H. Chi, B. G. Jung, S. K. Park, J. H. Park, J. R. Lee, S. S. Lee, J. C. Moon, J. W. Yun, Y. O. Choi, W. Y. Kim, J. S. Kang, G. W. Cheong, D. J. Yun, S. G. Rhee, M. J. Cho and S. Y. Lee (2004). "Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function." Cell **117**(5): 625-635.
- Johnson, M. H. and M. H. Nasr-Esfahani (1994). "Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos *in vitro*?" BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology **16**(1): 31-38.
- Jones, D. P. and H. Sies (2015). "The Redox Code." Antioxid Redox Signal **23**(9): 734-746.
- Kang, J. T., D. K. Kwon, S. J. Park, S. J. Kim, J. H. Moon, O. J. Koo, G. Jang and B. C. Lee (2013). "Quercetin improves the *in vitro* development of porcine oocytes by decreasing reactive oxygen species levels." J Vet Sci **14**(1): 15-20.
- Khazaei, M. and F. Aghaz (2017). "Reactive Oxygen Species Generation and Use of Antioxidants during *In vitro* Maturation of Oocytes." Int J Fertil Steril **11**(2): 63-70.
- Kitagawa, Y., K. Suzuki, A. Yoneda and T. Watanabe (2004). "Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos." Theriogenology **62**(7): 1186-1197.
- Kwak, S. S., S. A. Cheong, Y. Jeon, E. Lee, K. C. Choi, E. B. Jeung and S. H. Hyun (2012). "The effects of resveratrol on porcine oocyte *in vitro* maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and *in vitro* fertilization." Theriogenology **78**(1): 86-101.
- Lapointe, J. and J. F. Bilodeau (2003). "Antioxidant defenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle." Biol Reprod **68**(4): 1157-1164.

- Lapointe, S., R. Sullivan and M. A. Sirard (1998). "Binding of a bovine oviductal fluid catalase to mammalian spermatozoa." Biol Reprod **58**(3): 747-753.
- Lazze, M. C., R. Pizzala, M. Savio, L. A. Stivala, E. Prospero and L. Bianchi (2003). "Anthocyanins protect against DNA damage induced by tert-butyl-hydroperoxide in rat smooth muscle and hepatoma cells." Mutat Res **535**(1): 103-115.
- Leopoldini, M., N. Russo, S. Chiodo and M. Toscano (2006). "Iron chelation by the powerful antioxidant flavonoid quercetin." J Agric Food Chem **54**(17): 6343-6351.
- Leopoldini, M. R., N.; Toscano, M. (2011). "The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants." Food Chemistry **125**: 19.
- Levy, R. R., H. Cordonier, J. C. Czyba and J. F. Guerin (2001). "Apoptosis in preimplantation mammalian embryo and genetics." Ital J Anat Embryol **106**(2 Suppl 2): 101-108.
- Li, J., R. H. Foote and M. Simkin (1993). "Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase, taurine, or superoxide dismutase." Biol Reprod **49**(1): 33-37.
- Li, W., K. Goossens, M. Van Poucke, K. Forier, K. Braeckmans, A. Van Soom and L. J. Peelman (2016). "High oxygen tension increases global methylation in bovine 4-cell embryos and blastocysts but does not affect general retrotransposon expression." Reprod Fertil Dev **28**(7): 948-959.
- Limaye, P. V., N. Raghuram and S. Sivakami (2003). "Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats." Mol Cell Biochem **243**(1-2): 147-152.
- Lindenbaum, A. (1973). "A survey of naturally occurring chelating ligands." Adv Exp Med Biol **40**: 67-77.
- Liu, L., J. R. Trimarchi, P. Navarro, M. A. Blasco and D. L. Keefe (2003). "Oxidative stress contributes to arsenic-induced telomere attrition, chromosome instability, and apoptosis." The Journal of biological chemistry **278**(34): 31998-32004.
- Lledias, F., P. Rangel and W. Hansberg (1998). "Oxidation of catalase by singlet oxygen." J Biol Chem **273**(17): 10630-10637.
- Luberda, Z. (2005). "The role of glutathione in mammalian gametes." Reproductive biology **5**(1): 5-17.
- Luvoni, G. C., L. Keskinetepe and B. G. Brackett (1996). "Improvement in bovine embryo production *in vitro* by glutathione-containing culture media." Mol Reprod Dev **43**(4): 437-443.
- Mehaisen, G. M., A. M. Saeed, A. Gad, A. O. Abass, M. Arafa and A. El-Sayed (2015). "Antioxidant Capacity of Melatonin on Preimplantation Development of Fresh and Vitrified Rabbit Embryos: Morphological and Molecular Aspects." PLoS One **10**(10): e0139814.
- Menezo, Y. J., E. Silvestris, B. Dale and K. Elder (2016). "Oxidative stress and alterations in DNA methylation: two sides of the same coin in reproduction." Reprod Biomed Online **33**(6): 668-683.
- Michiels, C., M. Raes, O. Toussaint and J. Remacle (1994). "Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress." Free Radic Biol Med **17**(3): 235-248.
- Mileo, A. M., D. Di Venere, C. Abbruzzese and S. Miccadei (2015). "Long Term Exposure to Polyphenols of Artichoke (*Cynara scolymus* L.) Exerts Induction of Senescence Driven Growth

- Arrest in the MDA-MB231 Human Breast Cancer Cell Line." Oxid Med Cell Longev **2015**: 363827.
- Mishra, A., I. J. Reddy, P. S. Gupta and S. Mondal (2016). "L-carnitine Mediated Reduction in Oxidative Stress and Alteration in Transcript Level of Antioxidant Enzymes in Sheep Embryos Produced *In vitro*." Reprod Domest Anim **51**(2): 311-321.
- Mundim, T. C., A. F. Ramos, R. Sartori, M. A. Dode, E. O. Melo, L. F. Gomes, R. Rumpf and M. M. Franco (2009). "Changes in gene expression profiles of bovine embryos produced *in vitro*, by natural ovulation, or hormonal superstimulation." Genet Mol Res **8**(4): 1398-1407.
- Myers, N., R. A. Mittermeier, C. G. Mittermeier, G. A. da Fonseca and J. Kent (2000). "Biodiversity hotspots for conservation priorities." Nature **403**(6772): 853-858.
- Nasr-Esfahani, M., M. H. Johnson and R. J. Aitken (1990). "The effect of iron and iron chelators on the *in-vitro* block to development of the mouse preimplantation embryo: BAT6 a new medium for improved culture of mouse embryos *in vitro*." Hum Reprod **5**(8): 997-1003.
- Natarajan, R., M. B. Shankar and D. Munuswamy (2010). "Effect of alpha-tocopherol supplementation on *in vitro* maturation of sheep oocytes and *in vitro* development of preimplantation sheep embryos to the blastocyst stage." J Assist Reprod Genet **27**(8): 483-490.
- Navarro Hoyos, M., F. Sánchez-Patán, R. Murillo Masis, P. J. Martín-Álvarez, W. Zamora Ramirez, M. J. Monagas and B. Bartolomé (2015). "Phenolic Assesment of Uncaria tomentosa L. (Cat's Claw): Leaves, Stem, Bark and Wood Extracts." Molecules (Basel, Switzerland) **20**(12): 22703-22717.
- Navarro, P. A., L. Liu, R. A. Ferriani and D. L. Keefe (2006). "Arsenite induces aberrations in meiosis that can be prevented by coadministration of N-acetylcysteine in mice." Fertility and sterility **85 Suppl 1**: 1187-1194.
- Nedambale, T. L., F. Du, X. Yang and X. C. Tian (2006). "Higher survival rate of vitrified and thawed *in vitro* produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with beta-mercaptoethanol." Animal reproduction science **93**(1-2): 61-75.
- Nenadis, N., L. F. Wang, M. Tsimidou and H. Y. Zhang (2004). "Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS(*+) assay." J Agric Food Chem **52**(15): 4669-4674.
- Noda, Y., H. Matsumoto, Y. Umaoka, K. Tatsumi, J. Kishi and T. Mori (1991). "Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block." Mol Reprod Dev **28**(4): 356-360.
- Oh, S. J., S. P. Gong, S. T. Lee, E. J. Lee and J. M. Lim (2007). "Light intensity and wavelength during embryo manipulation are important factors for maintaining viability of preimplantation embryos *in vitro*." Fertil Steril **88**(4 Suppl): 1150-1157.
- Olson, S. E. and G. E. Seidel, Jr. (2000). "Culture of *in vitro*-produced bovine embryos with vitamin E improves development *in vitro* and after transfer to recipients." Biol Reprod **62**(2): 248-252.
- Orsi, N. M. and H. J. Leese (2001). "Protection against reactive oxygen species during mouse preimplantation embryo development: role of EDTA, oxygen tension, catalase, superoxide dismutase and pyruvate." Molecular reproduction and development **59**(1): 44-53.
- Pabon, J. E., Jr., W. E. Findley and W. E. Gibbons (1989). "The toxic effect of short exposures to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development." Fertility and sterility **51**(5): 896-900.

- Raha, S., G. E. McEachern, A. T. Myint and B. H. Robinson (2000). "Superoxides from mitochondrial complex III: the role of manganese superoxide dismutase." Free Radic Biol Med **29**(2): 170-180.
- Rathbun, W. B. and D. L. Murray (1991). "Age-related cysteine uptake as rate-limiting in glutathione synthesis and glutathione half-life in the cultured human lens." Experimental eye research **53**(2): 205-212.
- Rayman, M. P. (2000). "The importance of selenium to human health." Lancet **356**(9225): 233-241.
- Renaud, S. and M. de Lorgeril (1992). "Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease." Lancet **339**(8808): 1523-1526.
- Rhee, S. G. and H. A. Woo (2011). "Multiple functions of peroxiredoxins: peroxidases, sensors and regulators of the intracellular messenger H₂O₂, and protein chaperones." Antioxid Redox Signal **15**(3): 781-794.
- Rinaudo, P. and R. M. Schultz (2004). "Effects of embryo culture on global pattern of gene expression in preimplantation mouse embryos." Reproduction **128**(3): 301-311.
- Rizos, D., A. Gutierrez-Adan, S. Perez-Garnelo, J. De La Fuente, M. P. Boland and P. Lonergan (2003). "Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression." Biology of reproduction **68**(1): 236-243.
- Rizos, D., P. Lonergan, M. P. Boland, R. Arroyo-Garcia, B. Pintado, J. de la Fuente and A. Gutierrez-Adan (2002). "Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality." Biol Reprod **66**(3): 589-595.
- Rocha-Frigoni, N. A., B. C. Leao, E. Nogueira, M. F. Accorsi and G. Z. Mingoti (2014). "Reduced levels of intracellular reactive oxygen species and apoptotic status are not correlated with increases in cryotolerance of bovine embryos produced *in vitro* in the presence of antioxidants." Reprod Fertil Dev **26**(6): 797-805.
- Rodrigues-Cunha, M. C., L. G. Mesquita, F. Bressan, M. D. Collado, J. C. Balieiro, K. R. Schwarz, F. C. de Castro, O. Y. Watanabe, Y. F. Watanabe, L. de Alencar Coelho and C. L. Leal (2016). "Effects of melatonin during IVM in defined medium on oocyte meiosis, oxidative stress, and subsequent embryo development." Theriogenology **86**(7): 1685-1694.
- Sakatani, M., I. Suda, T. Oki, S. Kobayashi, S. Kobayashi and M. Takahashi (2007). "Effects of purple sweet potato anthocyanins on development and intracellular redox status of bovine preimplantation embryos exposed to heat shock." J Reprod Dev **53**(3): 605-614.
- Seiler, A., M. Schneider, H. Forster, S. Roth, E. K. Wirth, C. Culmsee, N. Plesnila, E. Kremmer, O. Radmark, W. Wurst, G. W. Bornkamm, U. Schweizer and M. Conrad (2008). "Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death." Cell Metab **8**(3): 237-248.
- Shkolnik, K., A. Tadmor, S. Ben-Dor, N. Nevo, D. Galiani and N. Dekel (2011). "Reactive oxygen species are indispensable in ovulation." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(4): 1462-1467.
- Sies, H. (2014). "Role of metabolic H₂O₂ generation: redox signaling and oxidative stress." J Biol Chem **289**(13): 8735-8741.
- Sies, H. (2017). "Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress." Redox Biol **11**: 613-619.

- Silva, E. M., J. N. S. Souza, H. Rogez, J. F. Rees and Y. Larondelle (2007). "Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region." Food Chemistry **101**(3): 1012-1018.
- Singleton, V. L., R. Orthofer and R. M. Lamuela-Raventós (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods in Enzymology, Academic Press. **299**: 152-178.
- Siqueira, E. M., F. R. Rosa, A. M. Fustinoni, L. P. de Sant'Ana and S. F. Arruda (2013). "Brazilian savanna fruits contain higher bioactive compounds content and higher antioxidant activity relative to the conventional red delicious apple." PLoS One **8**(8): e72826.
- Smith, G. D. and A. Monteiro da Rocha (2012). "Advances in embryo culture systems." Semin Reprod Med **30**(3): 214-221.
- Sovernigo, T. C., P. R. Adona, P. S. Monzani, S. Guemra, F. Barros, F. G. Lopes and C. Leal (2017). "Effects of supplementation of medium with different antioxidants during *in vitro* maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production." Reprod Domest Anim **52**(4): 561-569.
- Spricigo, J. F., R. Morato, N. Arcarons, M. Yeste, M. A. Dode, M. Lopez-Bejar and T. Mogas (2017). "Assessment of the effect of adding L-carnitine and/or resveratrol to maturation medium before vitrification on *in vitro*-matured calf oocytes." Theriogenology **89**: 47-57.
- Spyrou, G., E. Enmark, A. Miranda-Vizueté and J. Gustafsson (1997). "Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin." J Biol Chem **272**(5): 2936-2941.
- Sunderam, S., D. M. Kissin, S. B. Crawford, S. G. Folger, D. J. Jamieson, W. D. Barfield, C. Centers for Disease and Prevention (2014). "Assisted reproductive technology surveillance--United States, 2011." MMWR Surveill Summ **63**(10): 1-28.
- Takahashi, M., T. Nagai, S. Hamano, M. Kuwayama, N. Okamura and A. Okano (1993). "Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos." Biology of reproduction **49**(2): 228-232.
- Takahashi, M., T. Nagai, N. Okamura, H. Takahashi and A. Okano (2002). "Promoting effect of beta-mercaptoethanol on *in vitro* development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos." Biology of reproduction **66**(3): 562-567.
- Takahashi, T., Y. Inaba, T. Somfai, M. Kaneda, M. Geshi, T. Nagai and N. Manabe (2013). "Supplementation of culture medium with L-carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced *in vitro*." Reprod Fertil Dev **25**(4): 589-599.
- Takao, L. K., M. Imatomi and S. C. Gualtieri (2015). "Antioxidant activity and phenolic content of leaf infusions of Myrtaceae species from Cerrado (Brazilian Savanna)." Braz J Biol **75**(4): 948-952.
- Takenaka, M., T. Horiuchi and R. Yanagimachi (2007). "Effects of light on development of mammalian zygotes." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(36): 14289-14293.
- Taverne, Y. J., D. Merkus, A. J. Bogers, B. Halliwell, D. J. Duncker and T. W. Lyons (2018). "Reactive Oxygen Species: Radical Factors in the Evolution of Animal Life: A molecular timescale from Earth's earliest history to the rise of complex life." Bioessays **40**(3).
- Umaoka, Y., Y. Noda, T. Nakayama, K. Narimoto, T. Mori and A. Iritani (1992). "Effect of visual light on *in vitro* embryonic development in the hamster." Theriogenology **38**(6): 1043-1054.

- Umaoka, Y., Y. Noda, K. Narimoto and T. Mori (1992). "Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos." Molecular reproduction and development **31**(1): 28-33.
- Van Soom, A., I. Van Vlaenderen, A. R. Mahmoudzadeh, H. Deluyker and A. de Kruif (1992). "Compaction rate of *in vitro* fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage." Theriogenology **38**(5): 905-919.
- Vandaele, L., B. Mateusen, D. Maes, A. de Kruif and A. Van Soom (2006). "Is apoptosis in bovine *in vitro* produced embryos related to early developmental kinetics and *in vivo* bull fertility?" Theriogenology **65**(9): 1691-1703.
- Vu, H. V., S. Lee, T. J. Acosta, S. Yoshioka, H. Abe and K. Okuda (2012). "Roles of prostaglandin F2alpha and hydrogen peroxide in the regulation of Copper/Zinc superoxide dismutase in bovine corpus luteum and luteal endothelial cells." Reprod Biol Endocrinol **10**: 87.
- Wale, P. L. and D. K. Gardner (2010). "Time-lapse analysis of mouse embryo development in oxygen gradients." Reprod Biomed Online **21**(3): 402-410.
- Wale, P. L. and D. K. Gardner (2012). "Oxygen regulates amino acid turnover and carbohydrate uptake during the preimplantation period of mouse embryo development." Biol Reprod **87**(1): 24, 21-28.
- Wang, Z., C. Fu and S. Yu (2013). "Green tea polyphenols added to IVM and IVC media affect transcript abundance, apoptosis, and pregnancy rates in bovine embryos." Theriogenology **79**(1): 186-192.
- Wang, Z. G., S. D. Yu and Z. R. Xu (2007). "Effect of supplementation of green tea polyphenols on the developmental competence of bovine oocytes *in vitro*." Braz J Med Biol Res **40**(8): 1079-1085.
- Wang, Z. G., S. D. Yu and Z. R. Xu (2007). "Improvement in bovine embryo production *in vitro* by treatment with green tea polyphenols during *in vitro* maturation of oocytes." Anim Reprod Sci **100**(1-2): 22-31.
- Woo, H. A., S. H. Yim, D. H. Shin, D. Kang, D. Y. Yu and S. G. Rhee (2010). "Inactivation of peroxiredoxin I by phosphorylation allows localized H(2)O(2) accumulation for cell signaling." Cell **140**(4): 517-528.
- Wood, Z. A., L. B. Poole and P. A. Karplus (2003). "Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling." Science **300**(5619): 650-653.
- Yang, M., J. Tao, M. Chai, H. Wu, J. Wang, G. Li, C. He, L. Xie, P. Ji, Y. Dai, L. Yang and G. Liu (2017). "Melatonin Improves the Quality of Inferior Bovine Oocytes and Promoted Their Subsequent IVF Embryo Development: Mechanisms and Results." **22**(12).
- Ye, R., S. Xu, Y. Liu, L. Pang, X. Lian, Y. Zhong, Y. Su and S. Wang (2017). "Protective Effect of Icaritin on the Development of Preimplantation Mouse Embryos against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Injury." Oxid Med Cell Longev **2017**: 2704532.
- You, J., J. Kim, J. Lim and E. Lee (2010). "Anthocyanin stimulates *in vitro* development of cloned pig embryos by increasing the intracellular glutathione level and inhibiting reactive oxygen species." Theriogenology **74**(5): 777-785.
- Yu, S., H. Long, Q. F. Lyu, Q. H. Zhang, Z. G. Yan, H. X. Liang, W. R. Chai, Z. Yan, Y. P. Kuang and C. Qi (2014). "Protective effect of quercetin on the development of preimplantation mouse embryos against hydrogen peroxide-induced oxidative injury." PLoS One **9**(2): e89520.

Yuan, Y. Q., A. Van Soom, F. O. Coopman, K. Mintiens, M. L. Boerjan, A. Van Zeveren, A. de Kruif and L. J. Peelman (2003). "Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured *in vitro*." Theriogenology **59**(7): 1585-1596.

CAPÍTULO 2

**EXTRATO ETANÓLICO DE FOLHAS SECAS DE PLANTAS DO CERRADO
MELHORA A QUALIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*.**

1 RESUMO

O cultivo *in vitro* induz uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS), que afeta a produção e qualidade dos embriões. Compostos antioxidantes sintéticos já foram utilizados para minimizar os efeitos deletérios do estresse oxidativo em embriões produzidos *in vitro* (PIVE) e, conseqüentemente, melhorar sua qualidade e criotolerância. Entretanto, a demanda para o uso por antioxidantes mais eficientes, estáveis, com propriedades relativamente seguras e não tóxicas é crescente entre os grupos de pesquisa. Portanto, o presente estudo avaliou o efeito de extratos etanólicos obtidos de folhas de plantas do cerrado, ricos em polifenóis, no cultivo de embriões bovinos. Quatro experimentos foram conduzidos para validar um extrato etanólico capaz de minimizar os efeitos adversos do estresse oxidativo e melhorar a qualidade embrionária. Em um primeiro momento, comparou-se o extrato etanólico de folhas secas de cinco plantas e selecionou-se duas com a maior capacidade antioxidante e com o maior teor de compostos fenólicos. Após essa etapa, foi determinada a melhor concentração dos extratos etanólicos de cagaita (*Eugenia dysenterica*) e murici (*Byrsonima crassifolia*), a ser utilizada durante o cultivo *in vitro*, na produção embrionária e na taxa de apoptose. Então, avaliou-se a influência da suplementação dos extratos na produção de ROS, de glutathiona (GSH) e na abundância de transcritos de genes relacionados à apoptose e ao metabolismo de ROS de blastocistos expandidos. Finalmente, foi avaliado o efeito da suplementação dos extratos etanólicos de folhas secas de cagaita e murici, durante o cultivo embrionário, na criotolerância dos blastocistos expandidos. Os resultados obtidos demonstraram uma redução significativa ($p < 0,05$) na proporção de células apoptóticas de embriões cultivados com 0,01mg/mL de extrato etanólico de cagaita, além de induzir um aumento nos níveis de transcritos de GPX4 e PRDX3. O extrato etanólico de murici também induziu um aumento na abundância de transcritos desses genes mas não reduziu a proporção de células apoptóticas. Além disso, os blastocistos expandidos cultivados com os extratos, na concentração de 0,01mg/mL e criopreservados, pelo método de transferência direta, obtiveram taxas de eclosão maiores e de degeneração menores ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo congelado sem a suplementação prévia com os extratos. Ainda, a taxa de apoptose dos embriões cultivados por 12 horas após a criopreservação foi menor ($p < 0,05$) nos grupos previamente expostos aos extratos durante o cultivo *in vitro*. Conclui-se que tais extratos podem ser uma alternativa para aumentar a criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Palavras-chave: Compostos fenólicos; criopreservação; antioxidantes.

2 ABSTRACT

In vitro embryo production (IVP) induces excessive production of reactive oxygen species (ROS), which affects blastocyst quality. Therefore, the supplementation of culture media with antioxidants is an alternative to overcome oxidative stress damage. However, there is growing demand for the use of antioxidant compounds that are more natural and less toxic in cell cultures. Therefore, the present study aimed to evaluate the effect of ethanolic extracts from *cerrado* leaves on IVP. Four experiments were conducted to identify an ethanolic extract concentration that would minimize the adverse effects of oxidative stress and improve embryonic quality. First, the antioxidant capacity and the amount of phenolic compounds of the leaves were evaluated. Then, the best ethanolic extract concentration composed of cagaita (*Eugenia dysenterica*) and murici (*Byrsonima crassifolia*) to be used during the *in vitro* culture of *in vitro* produced embryos, was determined. Afterwards, we evaluated the influence of the extract of both plants on the embryos' oxidative metabolism and apoptosis, by ROS and glutathione (GSH) production, while also evaluating the apoptosis and ROS metabolism gene expression. In a subsequent step, the effect of the ethanolic extracts of dried cagaita and murici leaves during embryonic cultivation on the cryotolerance of expanded blastocysts was studied. The results showed a significant reduction in the proportion of apoptotic cells from embryos cultivated with 0.01 mg/mL of cagaita ethanolic extract, besides inducing an increase in the GPX4 and PRDX3 transcription levels. Murici ethanolic extract induced an increase in the transcription abundance of these genes but did not reduce the proportion of apoptotic cells. In addition, expanded blastocysts cultivated with extracts at a concentration of 0.01 mg/mL and cryopreserved had higher hatching rates and lower degeneration rates when compared to the frozen group previously supplemented with the extracts. Moreover, the apoptosis rate of embryos cultured for 12 h after cryopreservation was lower in groups previously exposed to extracts during *in vitro* cultivation. Such extracts may be used as alternatives to increase the cryotolerance of *in vitro* produced embryos.

Key words: Phenolic compounds, cryopreservation, antioxidants

3. INTRODUÇÃO

Dentre as biotecnologias de reprodução assistida em bovinos, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) se destaca no cenário nacional, tanto na bovinocultura de corte quanto na bovinocultura de leite. Essa biotécnica permite a multiplicação rápida de animais geneticamente superiores e, conseqüentemente, proporciona um ganho genético bastante expressivo em um sistema produtivo. Nesse contexto, o Brasil assumiu uma posição de vanguarda ao consolidar-se, há mais de uma década, como um dos maiores produtores de embriões *in vitro* do mundo (VIANA et al, 2018). Entretanto, apesar dessa posição bastante significativa na produção embrionária, ainda há um desequilíbrio entre o número de embriões produzidos e a quantidade de receptoras aptas disponíveis. Diante desse entrave, a necessidade de criopreservar embriões excedentes torna-se evidente, pois possibilita uma logística economicamente viável para o sistema agropecuário, fazendo com que a transferência embrionária possa ser realizada em momento mais adequado, de acordo com as condições da propriedade. Além do impacto no setor produtivo, a criopreservação é indispensável para o comércio internacional de embriões e na conservação de raças e espécies ameaçadas de extinção.

Entretanto, os altos níveis de espécies reativas de oxigênio (do inglês — *reactive oxygen species* — ROS) produzidos no sistema de cultivo *in vitro* induzem um estresse oxidativo intracelular, responsáveis por causar injúrias moleculares e afetar a criotolerância em embriões PIVE (RIZOS et al. 2002, LI et al. 2016, BOMFIM et al. 2017, ANDRADE et al. 2019). Com isso, para garantir um desenvolvimento embrionário adequado, um equilíbrio entre a geração e a eliminação de ROS, fundamentais na transdução de sinais intracelulares (responsáveis pelo controle do ciclo celular, diferenciação e apoptose), deve ser mantido (JONES e SIES 2015, SIES 2017). Enquanto baixos níveis de ROS, produzidos *in vivo* por gametas e embriões, são necessários para a fecundação e o desenvolvimento inicial (HARVEY et al. 2002, SUNDERAM et al. 2014), altas concentrações têm sido associadas a uma diminuição da viabilidade embrionária, por induzir danos às biomoléculas (oxidação de carboidratos e

proteínas, fragmentação de ácidos nucleicos, peroxidação de lipídeos) e apoptose dos blastômeros (LEVY et al. 2001, LIU et al. 2003, NAVARRO et al. 2006).

Durante o desenvolvimento embrionário inicial, o ambiente tubárico fornece nutrientes, hormônios e fatores de crescimento até a chegada do embrião na luz uterina (HANNAN et al. 2011, THOUAS et al. 2015). Esse cenário é muito diferente do ambiente de cultivo *in vitro*, uma vez que a concentração atmosférica de oxigênio usada (20%), a exposição excessiva dos gametas à luz, a ausência de enzimas antioxidantes do trato genital, a utilização de excessivos volumes de meios de cultivo, além da natureza estática do embrião durante o cultivo, promovem um acúmulo de ROS e toxinas no meio de cultivo, os quais afetam a qualidade e a criotolerância dos embriões produzidos *in vitro* (SMITH e MONTEIRO DA ROCHA 2012, CASTILLO-MARTIN et al. 2014, WALE e GARDNER 2016).

Por esse motivo, a suplementação de compostos antioxidantes durante a PIVE é de suma importância, uma vez que controla a produção excessiva de ROS, além de melhorar a qualidade de embriões. De fato, estudos têm mostrado que a suplementação do meio de maturação e/ou meio de cultivo embrionário com compostos antioxidantes, tais como a cisteína, cisteamina, β -mercaptoetanol e cistina, é capaz de promover um incremento nas taxas e na qualidade embrionária (TAKAHASHI et al. 1993, DE MATOS e FURNUS 2000, DE MATOS et al. 2002, DE MATOS et al. 2002, FIDELIS 2014). No entanto, nem todas as concentrações e nem todos os tipos desses compostos tióis demonstraram efeitos benéficos na PIVE em diferentes espécies (DE MATOS et al. 2002, SONGSASEN e APIMETEETUMRONG 2002, MERLO et al. 2016). Logo, a demanda por antioxidantes mais eficientes, estáveis, com propriedades relativamente seguras e não tóxicas é crescente entre os grupos de pesquisa.

Os compostos fenólicos, oriundos do metabolismo secundário de plantas, possuem características antioxidantes já comprovadas, além de outras propriedades medicinais, como anti-inflamatórios naturais, antibióticos e antifúngicos (COSTA et al. 2000, AMARAL et al. 2014, CORREIA et al. 2016, BAPTISTA et al. 2018). O resveratrol, a icarina, a quercetina, a antocianina, são compostos fenólicos já testados na produção *in vitro* de embriões de mamíferos que resultaram em um incremento na qualidade embrionária (SAKATANI et al. 2007, YOU et al. 2010, KWAK et al. 2012, MUKHERJEE et al. 2014, ABE et al. 2017, SOVERNIGO et al. 2017, SPRICIGO et al. 2017, YE et al. 2017, HAYASHI et al. 2018, MADRID GAVIRIA et al. 2019). Isso sugere que os extratos de plantas podem ser mais uma alternativa para melhorar resultados da PIVE, não só devido a suas atividades antioxidantes,

mas porque também podem ter outras propriedades, além do controle do estresse oxidativo, as quais podem ser benéficas aos embriões.

Nesse contexto, o cerrado brasileiro, que é o segundo maior bioma da América do sul e a savana mais rica do mundo no que se refere a diversidade biológica, torna-se uma fonte potencial para a obtenção de compostos antioxidantes naturais. As plantas adaptadas ao solo e às condições climáticas adversas (com intensas queimadas) podem ter desenvolvido mecanismos moleculares eficientes de defesa contra ROS em seu processo de evolução, os quais envolvem a produção de potentes compostos antioxidantes, dentre outros compostos bioativos, já relatados por vários pesquisadores (SIQUEIRA et al. 2013, AMARAL et al. 2014, TAKAO et al. 2015, BAPTISTA et al. 2018).

Considerando o grande potencial antioxidante das plantas do bioma cerrado e a necessidade de testar novos compostos no controle do estresse oxidativo na rotina da PIVE bovina, objetivou-se avaliar o efeito da suplementação do meio de cultivo com extratos etanólicos de plantas do cerrado na qualidade e criotolerância de embriões bovinos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A menos que seja indicado, todos os reagentes utilizados foram comprados da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

4.1 Preparo dos extratos etanólicos de plantas nativas do cerrado.

As plantas selecionadas para obtenção dos extratos foram: cajuzinho (*Anacardium humile*), cagaita (*Eugenia dysenterica*), araticum (*Annona montana*), murici (*Byrsonima crassifolia*) e jenipapo (*Genipa americana*). As folhas foram coletadas manualmente, durante a estiagem de inverno (setembro de 2016) em Planaltina - Distrito Federal - Brasil (latitude de 15°34'S e na longitude de 47°43'O). Após a coleta e seleção, as folhas foram colocadas em estufa de secagem com circulação e renovação de ar a 37°C durante 48 horas. Depois de seco, o material foi triturado em moinho na granulometria de 1mm. O pó resultante foi colocado em béquer com etanol 99,3% PA, numa proporção 1:10 peso/volume. Em seguida, foi realizada a maceração (para obtenção do extrato bruto) à temperatura ambiente, sob agitação constante por 7 dias. Após essa etapa, o material foi filtrado, passando por evaporação térmica, com auxílio de mantas aquecedoras reguladas a temperatura de 50° C. Os extratos secos, depois de obtidos, foram armazenados, individualmente, em temperatura de -20°C. Para a avaliação da atividade antioxidante pelo método ABTS (2,2- azino - bis (ethylbenzo – thiazoline - 6 - sulfonic acid) e mensuração do teor de compostos fenólicos totais, pelo método de Folin – Ciocalteu, os extratos foram diluídos em solução salina (NaCl 0,9%) a uma concentração de 1mg/mL.

4.1.1 Ensaio da atividade antioxidante pela captura de radical livre – ABTS

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante dos extratos foi feita pelo monitoramento do consumo do cátion ABTS●+ pelas amostras, através da medida do decréscimo da absorbância de soluções de diferentes concentrações. Esse método baseia-se na geração do ABTS●+ (cor azul esverdeado) por meio da reação do ABTS com persulfato de

potássio, o qual possui absorção máxima em 734nm. Com a adição de um antioxidante, ocorre a redução do ABTS+• a ABTS, e conseqüentemente, há perda da coloração do meio reacional. Com a perda de cor, a porcentagem de inibição do ABTS•+ é determinada em função do Trolox, um padrão submetido às mesmas condições de análise do antioxidante (NENADIS et al. 2004). Em suma, quanto menor o valor de absorbância mensurado pelo espectrofotômetro, maior a atividade antioxidante.

Os extratos foram diluídos em solução salina numa concentração de 1mg/mL. Alíquotas de 30µL foram colocadas em tubos com 3 mL do radical ABTS•+, homogeneizados e lidos em espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu, Nakagyo/Kyoto, Japão), a 734nm, após seis minutos. Todas as amostras foram feitas em triplicatas. Uma curva padrão de absorbância do trolox (Figura 4) foi determinada em 5 concentrações (100, 500, 1000,1500 e 2000µM/L). A partir da equação gerada, a capacidade antioxidante equivalente ao Trolox dos extratos foi mensurada.

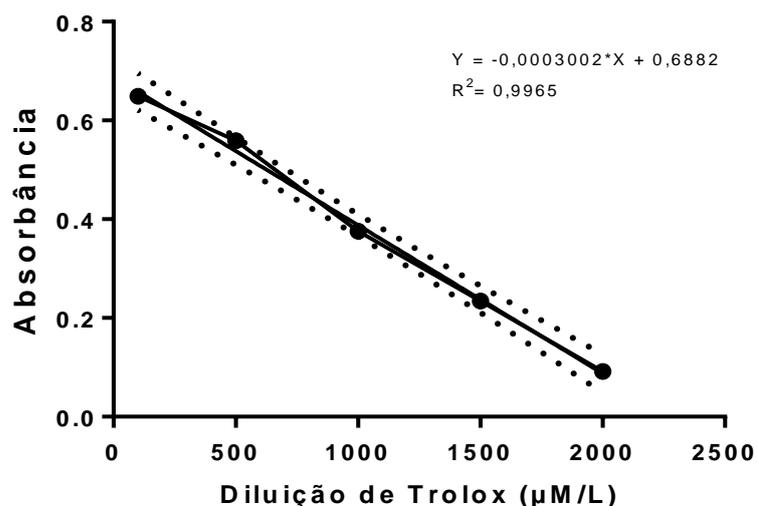


Figura 4: Curva padrão de absorbância do Trolox em micromolar por litro

4.1.2 Ensaio de determinação de compostos fenólicos por Folin Ciocalteu

A determinação do teor de compostos fenólicos dos extratos foi realizada utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, segundo Singleton (SINGLETON et al. 1999). A solução de Folin foi preparada utilizando o reagente Folin-Ciocalteu (Merck, Darmstadt, Alemanha) e água deionizada 1:1 (v/v). Foram adicionados 30µL do extrato etanólico (1mg/mL) e 75µL da solução de Folin em um tubo eppendorf (Eppendorf, São Paulo, Brasil). Após cinco minutos de reação, foram adicionados 75µL de solução de carbonato de sódio (20%). Utilizou-se água deionizada até atingir um volume final de 600 µL. A solução reagiu

por 30 minutos e a leitura feita em seguida, em espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu) a 750nm. O ácido gálico foi usado como padrão. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100g de extrato. Todas as amostras foram feitas em triplicatas.

4.2 Produção *in vitro* dos embriões

Os ovócitos utilizados para a produção *in vitro* de embriões foram obtidos de ovários de abatedouro, os quais foram transportados ao laboratório em solução salina (NaCl, 0,9%), suplementada com amicacina (250 µg/mL), em uma temperatura de 35°C. Os folículos de 3 a 8 mm foram aspirados com auxílio de seringa e agulha (18G). Os ovócitos foram selecionados de acordo com aparência e número de camadas de células do cumulus e homogeneidade de citoplasma. Apenas os classificados em graus I e II foram utilizados (STOJKOVIC et al. 2001). O tempo entre o início da aspiração dos ovários de abatedouro até a seleção e maturação dos ovócitos era de uma hora.

Durante cada etapa da PIVE, gotas com volume de 150µL do meio específico (maturação, fecundação ou cultivo) foram usadas e cobertas com óleo mineral, mantidas em estufas com atmosfera de 5% de CO₂, com temperatura de 38,5° C e umidade controlada.

Na maturação *in vitro*, grupos de 25 a 30 ovócitos foram colocados em gotas de 150µL com meio de maturação *in vitro* (MIV) cobertas com óleo mineral e incubados por 22 – 24 horas em estufa. O meio de MIV era composto de TCM 199 sais de Earl's (Gibco BRL, Burlington, ON, Canada) suplementado com 10% de soro fetal bovino SFB (Gibco), 10 µg/mL de hormônio folículo estimulante (FSH), 1 µg/mL de L-glutamina, 250 mg/mL de sulfato de amicacina.

Após a MIV, os ovócitos foram fecundados *in vitro*. As doses de sêmen utilizadas em todos os experimentos foram do mesmo touro e da mesma partida de congelamento, previamente testadas. Os espermatozoides móveis foram selecionados pela técnica de gradiente (90%:45%) de Percoll (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) em microtubos, segundo descrito por Machado et al. (2009). A dose inseminante foi ajustada para concentração final de 1×10^6 espermatozoides/mL. Os gametas foram co-incubados, por 12 horas, em meio de fecundação que consistiu de meio Tyrode Albumina Lactato Pyruvato (TALP) suplementado com 2 mM de penicilamina, 1 mM de hipotaurina, 250 mM de epinefrina e 10 µg/mL de heparina (PARRISH et al. 1995). Os prováveis zigotos foram lavados e transferidos para o meio de cultivo Fluido Sintético de Oviduto SOF – suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais, 0,34 mM de sodium tri citrato, 2,77 mM de myo-

inositol e 5% SFB (HOLM e CALLESEN 1998), em uma atmosfera de 5% de CO₂, com temperatura de 38,5° C e umidade controlada. O momento da inseminação foi considerado como dia 0 (zero). A taxa de clivagem foi avaliada em D2 (48 horas pós- inseminação – pi). As taxas de blastocistos foram analisadas em D6 (144 horas pi) e em D7 (168 horas pi).

4.2.1 Adição dos extratos etanólicos de folhas secas de cagaita e murici no meio de cultivo embrionário.

Para todos os experimentos, o mesmo extrato etanólico seco, armazenado a -20°C, foi utilizado. Uma solução estoque do extrato foi produzida com solução fisiológica, a uma concentração de 10mg/mL. Essa solução estoque do extrato, no momento de ser adicionada ao meio de cultivo (SOF), foi diluída em solução fisiológica até alcançar as concentrações dos grupos tratados (Controle: sem adição do extrato; 0,01mg/mL do extrato de cagaita (Cag0,01) e de murici (Mur0,01); 0,1mg/mL do extrato de cagaita (Cag0,1) e de murici (Mur0,1) e 1mg/mL do extrato de cagaita (Cag1) e de murici (Mur1).

4.3 Mensuração de atividade antioxidante no meio de cultivo embrionário pelo método ABTS

Para a mensuração da atividade antioxidante do extrato diluído em SOF, uma alíquota (100µL) de cada grupo foi separada no momento do preparo das gotas de cultivo (D0). Aos sete dias de cultivo, logo após a avaliação dos embriões, foi retirada outra amostra (100µL) do meio de cada grupo. Para avaliar o efeito do sistema de cultivo na atividade antioxidante dos extratos testados (controle de estufa), uma outra placa foi preparada simultaneamente de forma idêntica a descrita anteriormente, entretanto nenhum embrião foi colocado nas gotas. Amostras de meio dessa placa também foram coletadas no D0 e no D7. Todas as alíquotas obtidas de cada grupo (0mg/mL; 0,01mg/mL; 0,1 mg/mL; 1 mg/mL) nos dois momentos (D0 e D7), das duas placas (placa de cultivo e placa controle sem embrião) foram armazenadas a -20°C até a análise da atividade antioxidante pelo método ABTS. A análise da atividade antioxidante foi efetuada conforme descrito no item 4.1.1.

4.4 Contagem total de células embrionárias e de células apoptóticas pelo método de TUNEL.

Apenas blastocistos expandidos (BX) de cada grupo foram submetidos ao método TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling* — Thermofisher, Waltham, MA, EUA) para determinar o número total de células e de células

apoptóticas. O método utilizado consiste em detectar fragmentação do DNA, por meio de incorporação de nucleotídeos (d-UTP) marcados com corante fluorescente, na extremidade 3'OH da quebra do DNA. Essa reação é catalisada pela enzima deoxinucleotidil terminal transferase (ARAMA e STELLER 2006).

Os BX de cada grupo foram lavados em gotas de PBS suplementados com BSA (1mg/mL) e, em seguida, fixados em paraformaldeído a 3,7%, por 15min. Após fixados e novamente lavados em PBS + BSA, os embriões foram incubados com Triton – X a 0,5%, por 20 minutos. A etapa de incubação dos blastocistos com a mistura enzimática do TUNEL e Alexa Fluor 488 era iniciada e permanecia por 1 hora, à 37° C, em uma câmara escura. Após lavagem em PBS + BSA, os BX foram corados com o Hoechst 33342, por 15 minutos, sob a mesma temperatura da etapa anterior. Finalmente, os embriões foram lavados, colocados em lâminas de vidro e observados em microscópio de epifluorescência (Axioplan 2, Zeiss®). Os filtros de onda de excitação para o Alexa flúor foi de 495nm, com emissão de fluorescência em um espectro de 520nm (cor verde). Já para a visualização dos núcleos corados (em azul) com Hoechst, a excitação necessária era de 350nm, com emissão de fluorescência em 461nm. O número total de células (cor azul), assim como o número de células apoptóticas (cor verde) foram contados em microscopia de epifluorescência e a proporção apoptóticas/total foi estabelecida.

4.5 Mensuração de espécies reativas de oxigênio intracelular de embriões.

Os níveis intracelulares de ROS foram quantificados com o uso do diacetato de 6-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H2DCFDA), o qual foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluído em PBS a uma concentração de 10 mM. Os blastocistos expandidos de cada grupo foram lavados três vezes em gotas de PBS suplementados com BSA (1mg/mL) e, em seguida, colocados em uma placa de quatro poços — cada poço com 500 µL de 10mM H2DCFDA. A placa foi mantida por 30 minutos, em atmosfera escura, a 38,5°C, em uma placa aquecedora (WTA, Cravinhos SP Brasil). Após a incubação, os embriões foram lavados 3 vezes em gotas de PBS com BSA, colocados em uma placa de 35mm, com o fundo modificado, para visualização em microscopia confocal (TCS SP8, Leica Microsystems Wetzlar Alemanha). Essa placa continha quatro gotas de 10 µL de PBS+BSA aquecidas, uma para cada BX de cada grupo, e submersas em óleo mineral. O corante H2DCFDA possui absorção de 492-495nm e um máximo de emissão a 517-527 nm. O laser usado foi de 488nm, com potência laser de 9,14% para excitação e emissão gravada na faixa entre 475 e 535 nm, para obtenção e quantificação das intensidades de sinal de fluorescência (pixels). Todas as

aquisições de imagens foram feitas em um sistema vertical Leica SP8, usando lentes de 20x, com abertura numérica de 1,0 e corte da imagem em 2,52µm para todos os embriões analisados, assim como as demais configurações do microscópio. As imagens fluorescentes gravadas foram analisadas com o auxílio do software de imagem Adobe Photoshop CC 2017 versão 18.0.0 (Adobe Systems Incorporated, California, EUA). A resolução da figura foi de 72pixels e a escala de intensidade foi de zero, para ausência de fluorescência até 255, considerada o máximo de fluorescência gravável.

4.6 Mensuração de glutathiona intracelular de embriões.

Os níveis de GSH intracelulares foram quantificados com o marcador de fluorescência Cell Tracker Blue — 4-clorometil-6,8-di flúor-7-hidroxycumarina (Thermofisher), o qual foi dissolvido em DMSO e diluído em PBS a uma concentração de 10 mM. Os BX de cada grupo foram lavados três vezes em gotas de PBS suplementados com BSA (1mg/mL) e, em seguida, colocados em uma placa de quatro poços — cada poço com 500 µL de 10mM do corante. A placa foi mantida por 20 minutos, em atmosfera escura, a 37,0°C, em uma placa aquecedora (WTA). Os poços dos grupos com os extratos foram suplementados com 0,01mg/mL do respectivo extrato. Após a incubação, os embriões foram lavados 3 vezes em gotas de PBS com BSA e, logo após, colocados em lâminas para avaliação em microscopia de fluorescência (Axioplan 2, Zeiss®). A sonda fluorescente Cell Tracker Blue é excitada em 350nm e a emissão em 450nm. As imagens foram capturadas num aumento de 40x, com 10 segundos de exposição à luz ultravioleta. As imagens fluorescentes gravadas foram analisadas com o auxílio do software de imagem Adobe Photoshop CC 2017 versão 18.0.0 (Adobe Systems Incorporated, California, EUA). A resolução da figura foi de 72pixels e a escala de intensidade foi de zero, para ausência de fluorescência até 255, considerada o máximo de fluorescência gravável.

4.7 Síntese de cDNA e *polímerase chain reaction* (PCR) em tempo real

Os níveis de transcritos de quatro genes relacionados ao metabolismo de ROS (CAT- *Catalase*; SOD2 – *Manganês superóxido dismutase*; GPX4 – *Glutathiona Peroxidase 4*; PRDX3 – *Peroxiredoxina 3*), além de quatro genes envolvidos no processo de apoptose (CASP3 – *Caspase 3*; CASP 8 – *Caspase 8*; BCL2L1 – *B-Cell lymphoma protein 2*; BAX – *BCL2 associated protein X*) foram quantificados. O qPCR foi realizado em um 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, Califórnia, USA) usando três réplicas biológicas independentes. Os BX para quantificação dos transcritos foram produzidos (mesma

metodologia descrita acima) até formar 3 *pools* contendo 18 embriões por *pool* para cada tratamento, os quais foram armazenados, individualmente, em RNAlater até o momento da análise. O RNA total foi isolado usando o Kit RNeasy Plus Micro (Quiagen®, Hilden, Germany), de acordo com instruções do fabricante (com pequenas modificações). O volume total de RNA das amostras foi incubado diretamente com 1U DNase I (Invitrogen®/Life Technologies, New York, USA) a 37 °C por 30 minutos. A síntese de cDNA foi realizada usando SuperScriptIII (200 U / μ L, Invitrogen) e primer Oligo-dT (0,5 μ g / μ L, Invitrogen) em um volume final de 28 μ L. As reações foram realizadas a 65 °C por 5 minutos e 42 °C por 60 minutos, seguido pela inativação da enzima a 70 °C por 15 minutos. A qPCR foi realizada usando Fast Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems). As reações foram otimizadas para promover eficiência de amplificação máxima para cada gene (90 – 100%) por cálculos usando as curvas padrões relativas no programa 7500 2.0.3 (Applied Biosystems). Cada amostra foi analisada em triplicata e a especificidade de cada produto de PCR foi determinada pela análise da curva de *melting* e tamanho do amplicon em gel de agarose. As reações foram realizadas em um volume final de 25 μ L usando cDNA correspondente a 0,8 embrião. As condições dos ciclos do PCR foram 95 °C por 5 minutos, seguido de 50 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos e então anelamento a 60 °C por 1 minuto. O nome, a sequência e concentração do primer, tamanho do amplicon e temperatura de anelamento de cada gene estão listados na Tabela 1.

Os níveis de expressão dos três genes constitutivos, *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH), β -*Actin* (ACTB) e *Peptidylprolyl isomerase A* (PPIA) foram submetidos ao programa de análise GeNorm, que indicou o GAPDH como o gene mais estável. Este gene foi usado como referência para normalização dos dados. A expressão relativa de cada gene foi calculada usando o método de $\Delta\Delta$ Ct com correção da eficiência pelo método Pfaffl (PFAFFL 2001)

Tabela 1: Informações dos primers específicos usados para amplificação dos genes para o RT- qPCR.

Genes	Sequência de primer	Tamanho Amplicon (pb)	Concentração do primer (nM)	GeneBank Número de acesso/referência
GAPDH	F: GGC GTG AAC CAC GAG AAG TAT AA R: CCC TCC ACG ATG CCA AAG T	118	300	NM_001034034.2
SOD2	F: TTG CTG GAA GCC ATC AAA CGT GAC R: AAT CTG TAA GCG TCC CTG CTC CTT	135	300	NM_201527
CASP3	F: GCC CAG GAC TTT AGC AGT CA R: AAA TGT GAG CGC CTT TGT T	185	250	NM_001077840.1
CASP8	F: CAG AAC AGA TGG AAG CCT AT R: GGT TAG GAT GGT CAG AAT GT	209	250	NM_001045970.2
CATALASE	F: GAA TGA GGA GCA GAG GAA AC R: CTC CGA CCC TCA GAG ATT AG	241	300	NM_001035386.2
GPX4	F: CGC CGA GTG TGG TTT AC R: AGG TCC TTC TCT ATC ACC AG	315	300	NM_001346431.1
PRDX3	F: GGC AGG AAC TTT GAT GAG AT R: GTG TGT AGC GGA GGT ATT TC	205	300	NM_174643.1
BAX	F: TGC AGA GGA TGA TCG CAG CTG TG R: CCA ATG TCC AGC CCA TCA TGG TC	198	300	(MUNDIM et al. 2009)
BCL2-L1	F: GAG ATG CAG GTA TTG GTG AG R: GGT CAG TGT CTG GTC ATT TC	244	250	NM_001077486.2

F: *primer forward*; R: *primer reverse*

GAPDH: Gene constitutive

4.8 Criopreservação dos blastocistos expandidos

Após 168 horas de fecundação (D7), os blastocistos expandidos (BX) de qualidade 1 e 2 (BO e MAPLETOFT 2013) de cada grupo foram criopreservados, de acordo com o protocolo proposto por Sanches et al (2016). Resumidamente, os BX foram expostos à solução de congelamento (com 1,5M de etilenoglicol) por dez minutos, em temperatura ambiente (25°C). Após esse tempo de estabilização, 5 embriões de cada grupo foram envazados em uma palheta de 0,25mL, alocados em uma coluna (1cm) com a solução de congelamento, no centro da palheta. Outras quatro colunas foram formadas, com a solução de descongelamento (0,75M de etilenoglicol), duas acima e duas abaixo da coluna central, todas separadas por colunas de ar, com 1 cm cada. As palhetas foram colocadas em um equipamento de congelamento (FreezeControl - Cryologic®, Blackburn, Victoria, Austrália), previamente estabilizado em -6°C. A cristalização (*seeding*) dos BX foi induzida dois minutos após a inserção das palhetas na máquina. Os embriões permaneceram por dez minutos a -6°C até o início da curva de resfriamento, programada para -0,5°C por minuto, até atingir -32°C. Ao alcançar essa temperatura, os embriões foram submersos em nitrogênio líquido.

4.8.1 Descongelamento dos blastocistos expandidos

Após 5 minutos imersos em nitrogênio líquido, os embriões foram descongelados, de acordo com o protocolo proposto por Sanches et al (2016). As palhetas foram retiradas do nitrogênio líquido, expostas ao ar por 10 segundos e, logo em seguida, submersas em água, a 35°C, por 30 segundos. Após o descongelamento, as palhetas foram secadas com papel toalha e agitadas, para a mistura das soluções dentro da palheta. Os embriões foram retirados das palhetas e cultivados por 12 horas em estufa, com atmosfera de 5% de CO₂, temperatura de 38,5° C e umidade controlada. A partir de então, as avaliações de taxas de re-expansão, eclosão, degeneração, além da taxa de apoptose, foram realizadas.

4.9 Delineamento experimental.

EXPERIMENTO 1: Quantificação de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de folhas secas de plantas do cerrado brasileiro.

Neste experimento, cinco plantas nativas do cerrado foram selecionadas para obtenção do extrato etanólico das folhas secas. As espécies escolhidas fazem parte de um banco de plantas do laboratório para pesquisas de atividades anti-helmínticas, anti-inflamatórias e antimicrobianas do Centro Universitário de Brasília - UniCEUB. Foram elas: cajuzinho (*Anacardium humile*), cagaita (*Eugenia dysenterica*), araticum (*Annona montana*), murici (*Byrsonima crassifolia*) e jenipapo (*Genipa americana*). O objetivo do presente experimento foi determinar qual dos extratos etanólicos de folhas secas possuía o maior teor de compostos fenólicos totais (método de Folin-Ciocalteu) assim como a maior atividade antioxidante (método ABTS).

EXPERIMENTO 2: Determinação das melhores concentrações de extratos etanólicos de folhas secas de plantas do cerrado brasileiro na produção *in vitro* de embriões bovinos.

Os extratos etanólicos de folhas secas da cagaita e do murici mostraram, no experimento 1, os maiores valores de atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais (Tabela 2). Portanto, foram escolhidos para serem utilizados no experimento 2.

O objetivo desse experimento foi determinar a concentração mais adequada dos extratos de folhas secas da cagaita (*Eugenia dysenterica*) e do murici (*Byrsonima crassifolia*), adicionados ao meio de cultivo embrionário *in vitro* para o incremento na qualidade dos embriões (Figura 5). Devido ao grande número de ovócitos necessários por dia de manipulação para a realização do experimento, o extrato de cagaita e de murici foram usados em etapas

separadas. Quatro tratamentos foram delineados para cada extrato sendo um grupo controle, composto apenas com o meio de cultivo SOF sem adição de extrato (controle), e três grupos cultivados no SOF suplementado com concentração distinta dos extratos. O extrato de cagaita possuía os seguintes grupos: grupo com 0,01mg/mL do extrato (Cag0,01); grupo com 0,1mg/mL (Cag0,1) e Grupo com 1mg/mL (Cag1). Os grupos tratados com o extrato de murici também foram denominados de maneira similar (Mur0,01; Mur0,1 e Mur1).

Para avaliar a melhor concentração do extrato da folha seca de cagaita um total de 390 embriões de 902 ovócitos (43,2% de taxa de blastocisto) foi produzido, em sete repetições. Já para o extrato de murici, foram utilizados 684 ovócitos que produziram, em seis repetições, 196 embriões (taxa de blastocisto de 28,7%). Os parâmetros avaliados foram: taxa de clivagem e de blastocisto, cinética de desenvolvimento embrionário, número total de células e porcentagem de células apoptóticas pelo método do TUNEL.

Para avaliar se a presença do embrião e o tempo de cultivo afetam a atividade antioxidante dos extratos presentes no meio SOF, para cada tratamento/réplica foi adicionado um grupo, que consistia de uma gota com o meio suplementado com os extratos, mas sem os embriões. A atividade antioxidante foi avaliada no meio em dois momentos no D0 (preparação das gotas) e no D7 de cultivo. As amostras de meios foram submetidas a avaliação de atividade antioxidante pelo método ABTS

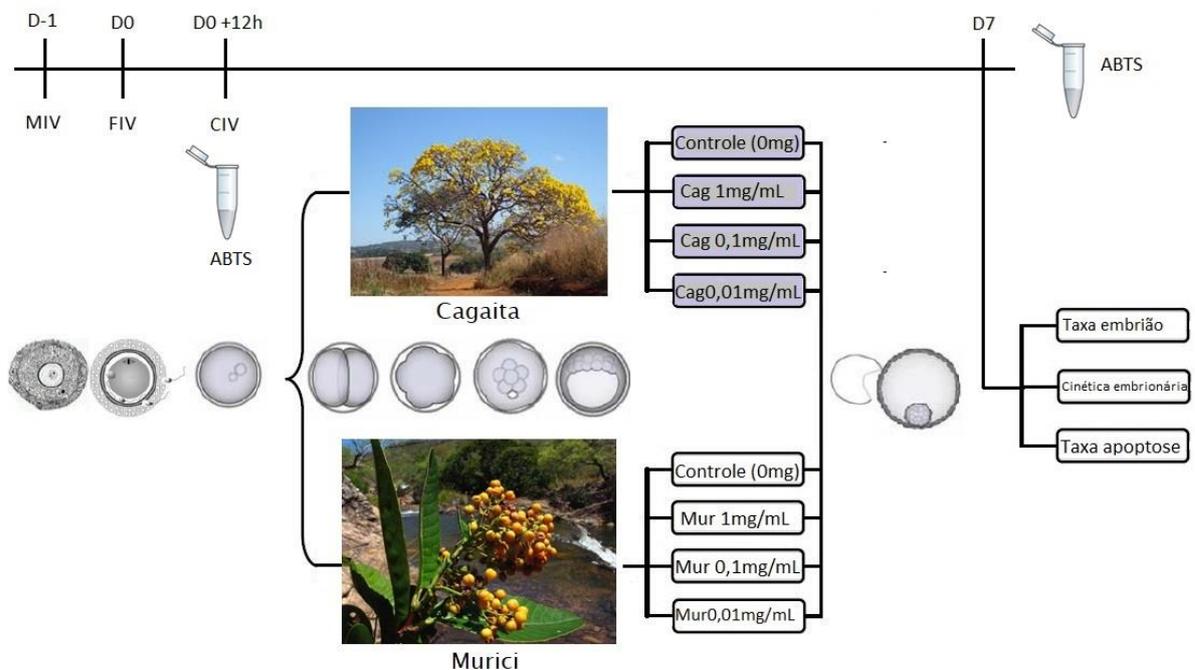


Figura 5: Esquema representativo do experimento 2 para avaliar a melhor concentração (Controle: 0 mg/mL; 0,01mg/mL; 0,1mg/mL; 1mg/mL) do extrato etanólico de cagaita e murici na produção *in vitro* de embriões. As variáveis avaliadas foram: taxa de embrião, cinética embrionária e taxa de apoptose. A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada pelo método ABTS nas amostras colhidas do meio de cultivo no D0 e no D7.

EXPERIMENTO 3: Efeito dos extratos etanólicos de folhas secas de cagaita e murici no metabolismo de ROS e apoptose de blastocistos produzidos *in vitro*.

O objetivo desse experimento foi avaliar a influência dos extratos na regulação do metabolismo de ROS e apoptose dos embriões. Nesta etapa, as melhores concentrações dos extratos de murici (Mur0,01) e cagaita (Cag0,01) — obtidas no experimento 2, pela avaliação de taxa de embrião e apoptose — foram selecionadas. Além dos tratamentos com adição dos extratos e do grupo controle, cultivado sob 20% de O₂, um outro grupo, cultivado em baixa tensão de O₂ (G5%), foi inserido com o objetivo de avaliar se a possível redução de ROS devido a presença dos extratos cultivado em alta tensão seria similar ao grupo cultivado com baixa tensão (Figura 6). Neste experimento, a produção *in vitro* dos embriões seguiu o protocolo descrito acima, exceto pelo grupo 5% de O₂, o qual foi realizada em estufa de baixa tensão de oxigênio (Eve, WTA, Cravinhos, SP, Brasil). Os prováveis zigotos desse grupo foram desnudados com auxílio de um vórtex (Scientific Industries, Nova York, EUA), em meio de lavagem — composto de TCM 199 com sais de Hank's (Gibco) suplementado com 1% de soro fetal bovino SFB e 250 mg/mL de sulfato de amicacina — por 1 minuto a 10.000 rpm. Logo após a centrifugação eram transferidos para o cultivo em estufa de baixa tensão de O₂ por sete dias.

Um total de 893 embriões de 2135 ovócitos (41,8% de taxa de blastocisto) foi produzido nesse experimento, em dez repetições, e os parâmetros avaliados, nesse experimento foram: mensuração dos níveis de ROS e de glutathiona (GSH) e a quantificação dos níveis de transcritos de genes relacionados ao estresse oxidativo e à apoptose em blastocistos expandidos. Além desses parâmetros, as taxas de clivagem, blastocisto em D6 e D7 também foram analisadas.

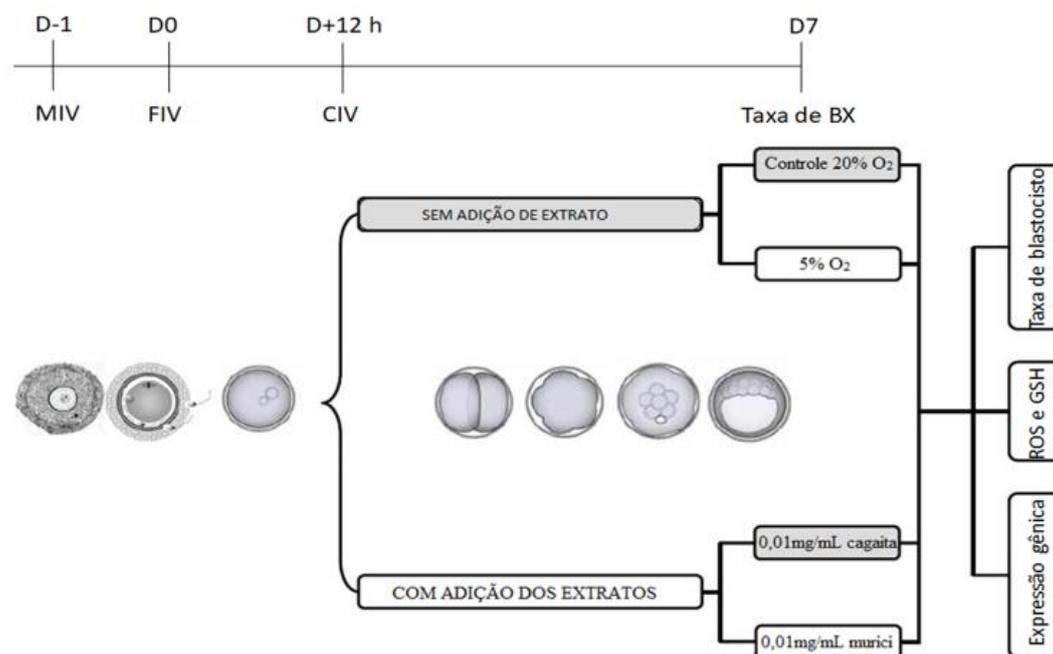


Figura 6: Esquema representativo do experimento 3 para avaliar a modulação de ROS em embriões produzidos *in vitro*. Os grupos formados a partir do cultivo foram separados de acordo com a adição do extrato etanólico (Grupo 0,01mg de murici e Grupo 0,01mg de cagaita). Já os grupos sem adição de extrato foram subdivididos em dois (grupo controle, com 20% de O₂ e grupo 5% de O₂). Os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), glutatona (GSH) e expressão de genes relacionados ao metabolismo de ROS e apoptose foram avaliados em blastocistos expandidos (BX), obtidos em D7.

EXPERIMENTO 4: Efeito dos extratos etanólicos de folhas secas de cagaita e murici na criotolerância de blastocistos expandidos produzidos *in vitro*.

Esse experimento teve por objetivo avaliar a criotolerância dos embriões cultivados com a suplementação dos extratos etanólicos secos de cagaita e murici. Os tratamentos utilizados foram: controle fresco (Controle), não submetido ao processo de congelamento, grupo controle congelado (GDT), Cag0,01, Mur0,01 e G5%, Todos os blastocistos expandidos de qualidade 1 e 2, exceto do grupo Controle (o qual permaneceu em temperatura ambiente), foram criopreservados conforme descrito por Sanches et al (2016). Foram produzidos, em nove repetições, 860 embriões de 1824 ovócitos (47, 14% de taxa embrionária). Os parâmetros avaliados nesse experimento foram: taxa de re-expansão, eclosão e degeneração (12, 24, 36 e 48 horas após o descongelamento e cultivo); produção de ROS, número total de células e taxa de apoptose em BX com 12 horas de cultivo pós descongelamento.

4.10 Análise estatística

A análise de atividade antioxidante pelo método ABTS assim como a quantidade de fenóis totais, pelo método de Folin-Ciocalceu foi feita por regressão linear. As taxas de

clivagem, de blastocisto em D6 e D7, cinética de desenvolvimento embrionário, re-expansão, eclosão, degeneração e apoptose, níveis intracelulares de ROS e GSH, assim como a abundância relativa de mRNA foram avaliadas por análise de variância (ANOVA), para dados paramétricos, e Kruskal-Wallis para dados não paramétricos. O teste de comparação de médias foi feito pelo teste de Tukey, com 5% de significância. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o *software* Prism 6, GraphPad, La Jolla, CA, EUA.

5. RESULTADOS

EXPERIMENTO 1: Quantificação de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de plantas do cerrado brasileiro.

Dos extratos etanólicos de folhas secas das cinco plantas avaliadas, os dois extratos com os maiores valores de atividade antioxidante foram o murici e a cagaita ($p < 0,05$), conforme demonstra a tabela 2. Já em relação ao teor de compostos fenólicos totais, o extrato de murici possuiu a maior concentração ($p < 0,05$). A escolha dos dois extratos foi baseada na atividade antioxidante. Por essa razão, o murici e a cagaita foram selecionados para serem testados no cultivo *in vitro* de embriões bovinos (experimento 2).

Tabela 2: Atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais (CFT) de extratos etanólicos de folhas secas de plantas do cerrado.

Plantas do cerrado	Atividade antioxidante (μM trolox/g)*	CFT (mg ácido gálico/100g)**
Araticum (<i>Annona montana</i>)	$190,6 \pm 3,7^c$	$192,15 \pm 17,3^b$
Cagaita (<i>Eugenia dysenterica</i>)	$729,72 \pm 10,2^a$	$201,15 \pm 10,7^b$
Cajuzinho (<i>Anacardium humile</i>)	$397,35 \pm 4,2^b$	$173,25 \pm 11,9^b$
Jenipapo (<i>Genipa americana</i>)	$89,18 \pm 3,8^d$	$111,73 \pm 12,4^c$
Murici (<i>Byrsonima crassifolia</i>)	$844,02 \pm 9,7^a$	$259,22 \pm 13,8^a$

Letras distintas na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$).

* A inibição do radical ABTS dos extratos é determinada em função do padrão de trolox em μM trolox/L de extrato

** A avaliação é feita pelo teste de Folin-Ciocalteu. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (padrão) por 100g de extrato.

EXPERIMENTO 2: Determinação das melhores concentrações do extrato etanólico de folhas secas de cagaita e murici na produção *in vitro* de embriões bovinos.

Para avaliar a melhor concentração do extrato da folha seca de cagaita um total de 390 embriões de 902 ovócitos (43,2% de taxa de blastocisto) foi produzido, em sete repetições (Tabela 3). Todos os grupos foram similares para a taxa de clivagem. Entretanto, o

grupo Cag1 mostrou uma menor taxa ($p < 0,05$) de blastocisto em D6 e em D7, quando comparado ao grupo Cag0,01.

Tabela 3: Taxa de produção e de células apoptóticas de blastocistos bovinos cultivados *in vitro* (porcentagem \pm desvio padrão) com diferentes concentrações, em mg/mL, de extrato etanólico de folhas secas de cagaita (*Eugenia dysenterica*).

	Controle	Cag0,01	Cag0,1	Cag1
Total de ovócitos (N)	222	223	231	226
Taxa de clivagem	$80,6 \pm 7,2$	$82,5 \pm 9,4$	$81 \pm 8,8$	$78,3 \pm 5,3$
Taxa de blastocisto em D6	$25,7 \pm 8,4^{ab}$	$34,1 \pm 13,4^a$	$25,5 \pm 8,2^{ab}$	$11,9 \pm 9,0^b$
Taxa de blastocisto em D7	$45,5 \pm 5,4^{ab}$	$50,2 \pm 14,4^a$	$42,4 \pm 6,0^{ab}$	$35 \pm 6,7^b$
Total de BX – TUNEL (N)	38	37	39	21
Número total de células	$140,6 \pm 29,9$	$139,6 \pm 31,7$	$125,5 \pm 33,4$	$120,2 \pm 27,2$
Proporção apoptóticas/total	$8,33 \pm 2,4^a$	$2,8 \pm 2,1^c$	$5,4 \pm 2,6^b$	$5 \pm 2,9^b$

Letras distintas na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$).

Grupo Controle: sem adição do extrato.

Bx: Blastocisto expandido

TUNEL: *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*

O número total de células dos blastocistos expandidos não diferiu entre os grupos testados ($p > 0,05$). Contudo, ao avaliar a proporção de células apoptóticas em relação ao total de células embrionárias, o grupo Cag0,01 mostrou a menor taxa (2,8%) quando comparada aos demais grupos. Os grupos Cag0,1 e Cag1 foram similares na proporção de células apoptóticas (Tabela 3, Figura 7).

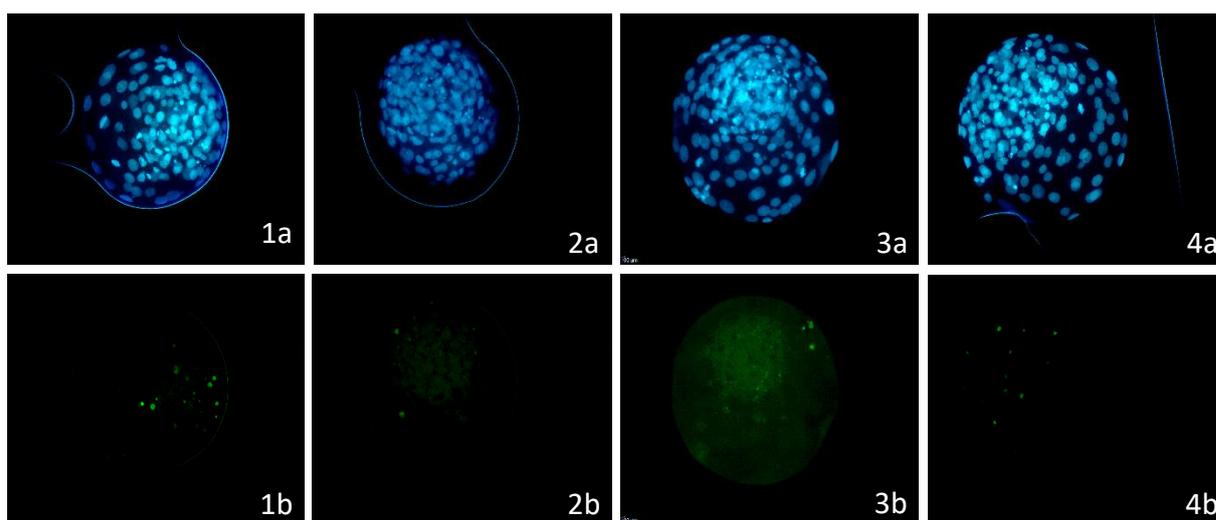


Figura 7: Número total de células (a) e células apoptóticas (b) em blastocisto expandido de embriões com diferentes concentrações de extrato etanólico de folhas secas de cagaita. 1: Controle (0mg/mL); 2: 0,01mg/mL; 3: 0,1mg/mL e 4: 1mg/ml.

Na avaliação da cinética do desenvolvimento embrionário, o grupo Cag1 demonstrou uma menor velocidade de desenvolvimento (menor quantidade de BX e maior quantidade de BL) em relação ao grupo Cag0,01 em D7 ($p < 0,05$). Os demais estágios embrionários foram similares entre os tratamentos ($p > 0,05$) conforme apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Velocidade de desenvolvimento embrionário com 144 (D6) e 168 horas (D7) pós fecundação — porcentagem (desvio padrão) com diferentes concentrações, em mg/mL, de extrato etanólico de folhas secas de cagaita (*Eugenia dysenterica*).

Tratamento	Dia 6				Dia 7					
	BI %	BL %	BX %	TOTAL	BI %	BL %	BX %	BN %	BE %	Total
Controle	63,3 ± 20,0	29,3 ± 16,3	7,4 ± 9,9	57	7,5 ± 7,8	29,6 ± 11,0 ^{ab}	57 ± 15,7 ^{ab}	3,4 ± 4,7	2,5 ± 3,3	101
Cag0,01	46,8 ± 16,8	38,5 ± 10,7	14,8 ± 11,6	76	8,1 ± 8,1	20,9 ± 10,9 ^b	67,5 ± 11,8 ^a	1,3 ± 2,2	2,2 ± 2,9	112
Cag0,1	41,6 ± 11,4	47,8 ± 11,7	10,6 ± 11,1	59	6,3 ± 9,0	23,7 ± 8,5 ^b	57,4 ± 17,4 ^{ab}	9,0 ± 3,1	3,7 ± 3,7	98
Cag1	54,2 ± 31,5	39,6 ± 27,1	6,3 ± 10,4	27	13,2 ± 14,6	49,8 ± 15,0 ^a	32,1 ± 17,4 ^b	2,4 ± 3,2	2,6 ± 3,4	79

Grupo Controle: sem adição do extrato.

BI: Blastocisto inicial; BL: blastocisto; BX: blastocisto expandido; BN: blastocisto em eclosão; BE: blastocisto eclodido.

Letras distintas na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$).

Quando o murici foi avaliado na PIV, foram utilizados 684 ovócitos que produziram 196 embriões (taxa de blastocisto de 28,7%) (tabela 5). A taxa de clivagem, assim como a produção embrionária em D6 e D7 foram similares em todos os grupos testados ($p > 0,05$), exceto para o grupo Mur1, o qual não chegou a clivar. A média do número total de células foi maior ($p < 0,05$) no grupo controle ($142,6 \pm 33,8$) em relação ao Mur0,1 ($114,2 \pm 24$).

Tabela 5: Taxa de produção e de células apoptóticas de blastocistos bovinos cultivados *in vitro* (porcentagem \pm desvio padrão) com diferentes concentrações, em mg/mL, de extrato etanólico de folhas secas de murici (*Byrsonima crassifolia*).

	Controle	Mur0,01	Mur0,1	Mur1
Total de ovócitos (N)	169	163	182	170
Taxa de clivagem	$80,5 \pm 8,5$	$78,0 \pm 11,1$	$81,9 \pm 9,1$	-
Taxa de blastocisto em D6	$30,2 \pm 9,1$	$31,9 \pm 10,3$	$23,6 \pm 15,4$	-
Taxa de blastocisto em D7	$40,8 \pm 2,5$	$38,7 \pm 8,1$	$35,2 \pm 12,5$	-
Total de BX – TUNEL (N)	23	24	27	-
Número total de células	$142,6 \pm 33,8^a$	$130,2 \pm 34,5^{ab}$	$114,2 \pm 24^b$	-
Porcentagem apoptóticas/total	$6,0 \pm 3,1$	$5,7 \pm 3,4$	$6,6 \pm 2,8$	-

Letras distintas na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$). Dados analisados por análise de variância - ANOVA

Grupo Controle: sem adição do extrato.

BX: Blastocisto expandido

TUNEL: *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*

A velocidade de desenvolvimento foi similar para todos os estágios embrionários, entre os grupos Controle, Mur0,1 e Mur0,01 (Tabela 6). Já o grupo Mur1 teve efeito deletério já no início do desenvolvimento, pois nenhum dos possíveis zigotos apresentou a primeira clivagem e, conseqüentemente, nenhum embrião foi produzido.

Tabela 6: Velocidade de desenvolvimento embrionário com 144 (D6) e 168 horas (D7) pós fecundação — porcentagem (desvio padrão) com diferentes concentrações de extrato etanólico de folhas secas de murici (*Byrsonima crassifolia*).

Tratamento	Dia 6				Dia 7				
	BI %	BL %	BX %	Total	BI %	BL %	BX %	BN %	Total
Controle	56,9 ± 20,5	40,4 ± 20,9	2,8 ± 4,6	51	9,7 ± 9,7	34,2 ± 10,1	56,1 ± 11,2	0	69
Mur0,01	49,3 ± 19,4	37,2 ± 22,9	13,5 ± 9,8	52	7,5 ± 7,5	31,4 ± 14	53,8 ± 10,9	7,2 ± 7,2	63
Mur0,1	48,3 ± 15,6	46,3 ± 15,8	5,4 ± 7,1	43	1,2 ± 2	49,6 ± 19,4	47,9 ± 19,5	1,3 ± 2,1	64
Mur1	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$) para todos os parâmetros analisados.

Grupo Controle: sem adição do extrato.

BI: Blastocisto inicial; BL: blastocisto; BX: blastocisto expandido; BN: blastocisto em eclosão.

A atividade antioxidante (Figura 8) do extrato etanólico de folha seca de cagaita não variou entre os tratamentos e entre os períodos de avaliação. Entretanto, o extrato de murici apresentou maior atividade antioxidante no D7 quando foi utilizado uma concentração de 1mg/mL.

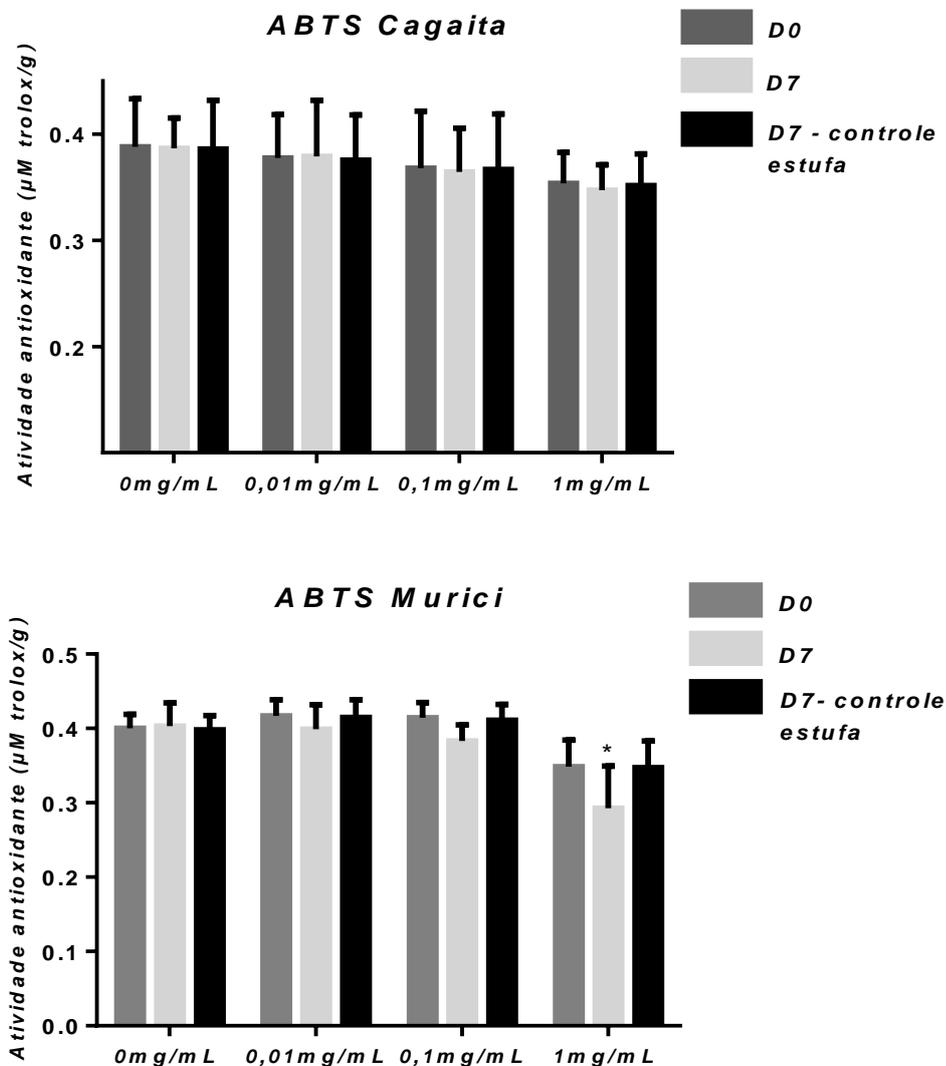


Figura 8: Atividade antioxidante dos extratos etanólicos de folhas secas de cagaita e murici pelo método ABTS em dois momentos no meio de cultivo *in vitro* de embriões. D0: primeiro dia de cultivo. D7: Após sete dias de cultivo. D7 – controle estufa: meio de cultivo com o extrato, sem cultivo de embriões.

* O grupo 1mg/mL de murici, em D7, diferiu (p<0,05) dos demais grupos avaliados em D7.

EXPERIMENTO 3: Efeito dos extratos etanólicos de cagaita e murici no metabolismo de ROS e apoptose de blastocistos produzidos *in vitro*.

3.1 Efeito dos extratos etanólicos (0,01mg/mL) de cagaita e murici na taxa de blastocistos produzidos *in vitro*.

Um total de 893 embriões de 2135 ovócitos (41,8% de taxa de blastocisto) foi produzido nesse experimento. Todos os parâmetros de produção embrionária foram semelhantes entre os grupos (Tabela 7).

Tabela 7: Taxa de produção de blastocistos bovinos cultivados *in vitro* (porcentagem \pm desvio padrão) sob diferentes sistemas de cultivo 20% de O₂ (sem a adição de extrato etanólico: controle; com a adição de 0,01mg/mL de extrato de folhas secas de cagaita (Cag0,01) ou de murici (Mur0,01) e 5% de O₂ (G5%).

	Controle	Cag0,01	Mur0,01	G5%
Total de ovócitos	547	561	544	483
Taxa de clivagem	87 \pm 8,1	89 \pm 7,30	89 \pm 8,3	88 \pm 9,5
Taxa de blastocisto em D6	26,5 \pm 12,2	23,9 \pm 10,3	27,2 \pm 12,9	26,7 \pm 16
Taxa de blastocisto em D7	42,7 \pm 6,2	42,9 \pm 6,20	41,1 \pm 5,4	40,1 \pm 8,4

Dados analisados por ANOVA, com 5% de significância ($p < 0,05$)

Grupo Controle: sem adição do extrato.

BI: Blastocisto inicial; BL: blastocisto; BX: blastocisto expandido; BN: blastocisto em eclosão.

Os parâmetros de velocidade de desenvolvimento embrionário, em D6 e D7, foram similares para todos os grupos ($p > 0,05$), em todos os estágios embrionários analisados (Tabela 8).

Tabela 8: Velocidade de desenvolvimento embrionário com 144 (Dia 6) e 168 (Dia 7) horas pós fecundação — (porcentagem \pm desvio padrão) sob diferentes sistemas de cultivo 20% de O₂ (sem a adição de extrato etanólico: controle; com a adição de 0,01mg/mL de extrato etanólico de folhas secas de cagaita (Cag0,01) ou de murici (Mur0,01) e 5% de O₂ (G5%).

Tratamento	Dia 6				Dia 7					
	BI %	BL %	BX %	Total	BI %	BL %	BX %	BN %	BE %	Total
Controle	49,3 \pm 22,4	33,7 \pm 19,2	17,0 \pm 14,2	145	11,7 \pm 9,8	31,0 \pm 8,0	52,6 \pm 16,0	3,8 \pm 3,3	1,0 \pm 1,6	234
Cag0,01	45,9 \pm 24,7	24,8 \pm 15,1	29,3 \pm 21,5	134	14,4 \pm 7,7	29,0 \pm 6,1	50,6 \pm 10,4	5,6 \pm 5,9	0,4 \pm 0,7	241
Mur0,01	49,3 \pm 16,4	29,5 \pm 8,2	21,2 \pm 15,2	148	14,6 \pm 10,3	26,5 \pm 9,1	51,7 \pm 7,6	6,1 \pm 6,9	1,1 \pm 1,9	224
G5%	43,1 \pm 23,3	38,1 \pm 14,4	18,8 \pm 16,5	129	13,3 \pm 11,1	32,6 \pm 6,1	48,5 \pm 14,1	5,2 \pm 4,5	0,5 \pm 0,8	194

Dados analisados por ANOVA, com 5% de significância (p<0,05)

Grupo Controle: sem adição do extrato.

BI: Blastocisto inicial; BL: blastocisto; BX: blastocisto expandido; BN: blastocisto em eclosão; BE: blastocisto eclodido.

3.2 Efeito dos extratos etanólicos de cagaita e murici na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e glutatona (GSH).

A emissão de fluorescência de ROS foi similar ($p > 0,05$) entre os grupos controle ($105,24 \pm 26,04$ pixels), Cag0,01 ($125,92 \pm 31,82$ pixels), Mur0,01 ($135,25 \pm 29,05$ pixels) e G5% ($116,05 \pm 27,51$ pixels). Resultados similares foram observados na avaliação dos níveis de emissão de fluorescência de GSH (Figura 9) entre os grupos controle ($156,36 \pm 11,39$ pixels), Cag0,01 ($159,98 \pm 10,89$ pixels), Mur0,01 ($155,36 \pm 14,07$ pixels) e G5% ($151,37 \pm 17,45$ pixels).

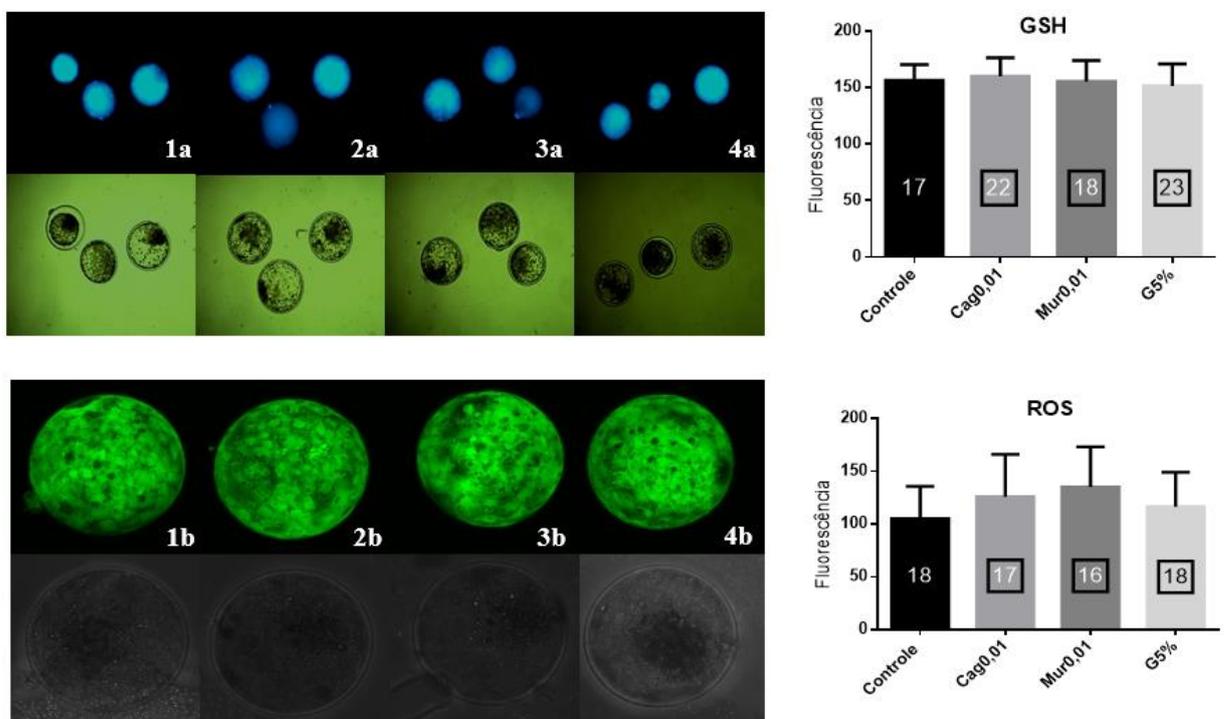


Figura 9: Níveis intracelulares de GSH em blastocistos expandidos bovinos avaliados com Cell Tracker Blue (a) e ROS, avaliados com H₂DCFDA (b) sob diferentes sistemas de cultivo a 20% de O₂: (1) Controle: sem suplementação com extrato etanólico; (2) Cag0,01: Com a adição de 0,01mg/mL de extrato etanólico de folhas secas de cagaita; (3) Mur0,01: : Com a adição de 0,01mg/mL de extrato etanólico de folhas secas de murici; (4)G5%: Embriões cultivados sob baixa tensão (5%) de O₂. O número de embriões usados em cada grupo está dentro do quadrado da respectiva coluna. Dados analisados por ANOVA, com 5% de significância ($p < 0,05$)

3.3 Efeito dos extratos etanólicos de cagaita e murici no nível de transcritos de genes relacionados à apoptose e metabolismo de ROS

Os resultados mostraram que os níveis de transcritos de três dos quatro genes relacionados à apoptose, BAX, CASP3 e CASP8, foram semelhantes ($p > 0,05$) entre os grupos (Figura 10). Porém, ao analisar o BCL2L1, a quantidade de transcritos do grupo controle foi maior do que o G5% ($p = 0,058$).

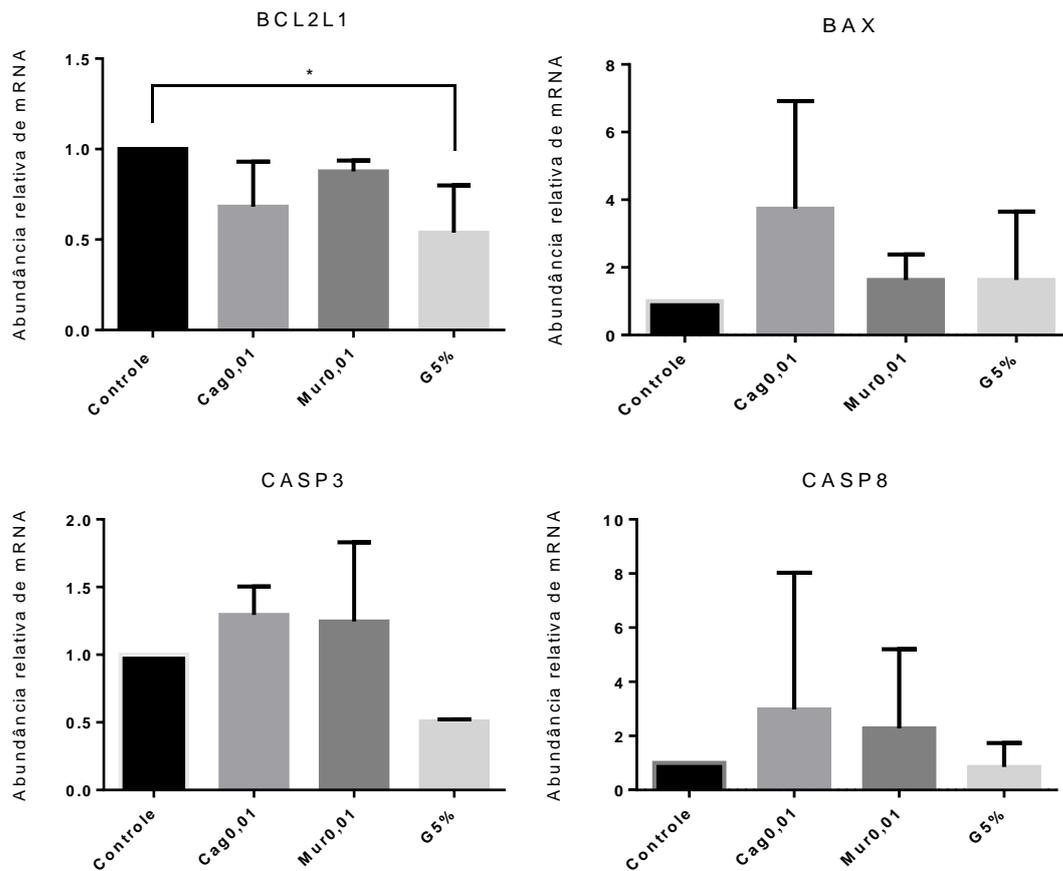


Figura 10: Quantidade relativa de mRNA dos genes envolvidos no processo de apoptose *BCL2L1*, *BAX*, *CASP3* e *CASP8* analisados pelo qPCR em blastocistos expandidos bovinos cultivados a 20% de O_2 , suplementado com 0,01mg/mL de extrato etanólico de folhas secas de cagaita, com 0,01mg/mL de extrato etanólico de folhas secas de murici e cultivado sob baixa tensão de O_2 (5%). Média \pm desvio padrão de três réplicas biológicas. Dados foram normalizados usando a fórmula $\Delta\Delta CT$ (PFAFFL 2001), usando-se o *GAPDH* como controle endógeno. * $p=0,058$ de significância pelo teste T.

Com relação aos genes envolvidos no metabolismo de ROS o GPX4 foi mais expresso ($p<0,05$) nos grupos cultivados com cagaita e murici do que no grupo sem a adição dos extratos (controle e G5%). O gene da peroxiredoxina 3 (PRDX3) foi mais expresso no grupo Mur0,01 em relação ao grupo G5% ($p<0,05$). Também houve um maior número de transcritos do grupo controle em relação ao G5% (Figura 11). A expressão dos demais genes do sistema antioxidante enzimático analisados (SOD2 e CAT) foram semelhantes entre os tratamentos ($p>0,05$).

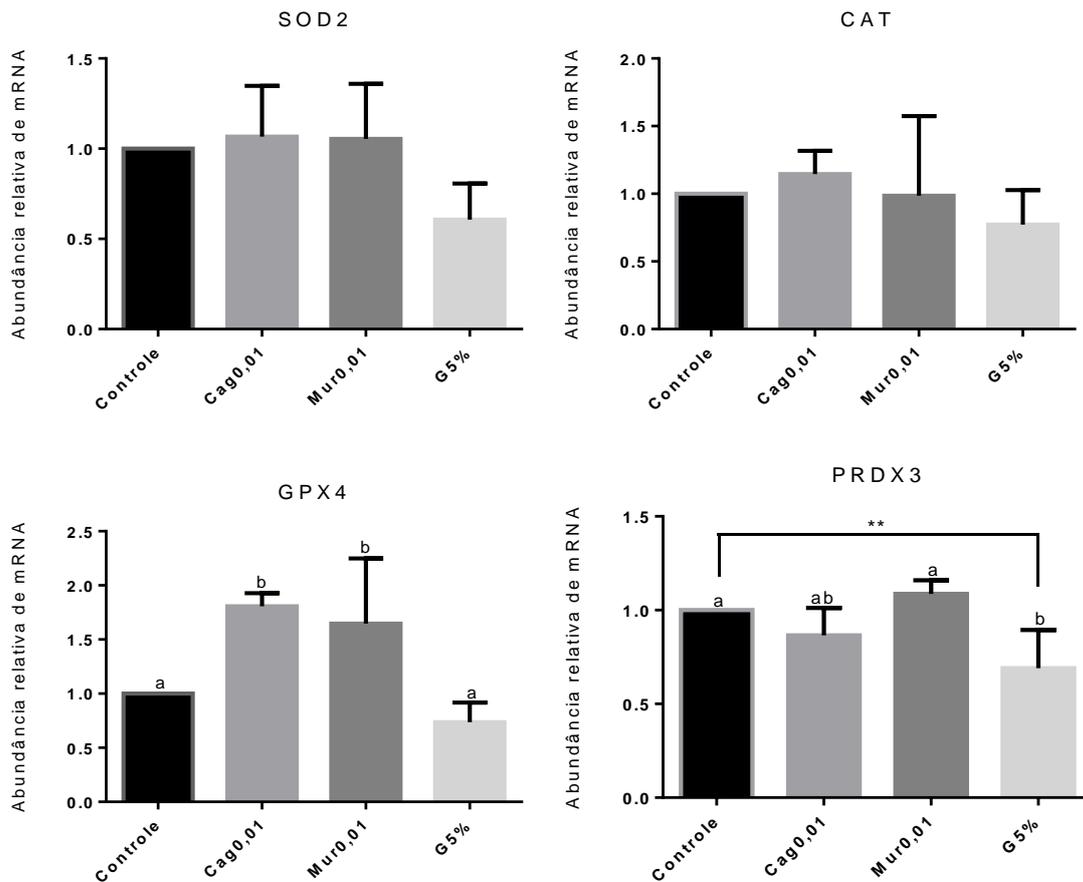


Figura 11: Quantidade relativa de mRNA dos genes envolvidos no metabolismo de espécies reativas de oxigênio *SOD2*, *CAT*, *GPX4* e *PRDX3* analisados pelo qPCR em blastocistos expandidos bovinos cultivados a 20% de O_2 , suplementado com 0,01mg/mL de extrato etanólico de folhas secas de cagaita, com 0,01mg/mL de extrato etanólico de folhas secas de murici e cultivado sob 5% de tensão de O_2 . Média \pm desvio padrão de três réplicas biológicas. Dados (Média \pm S.D) foram normalizados usando a fórmula $\Delta\Delta CT$ (PFAFFL 2001), usando-se o *GAPDH* como controle endógeno. Letras diferentes no mesmo gene diferem entre si ($P < 0,05$), pelo teste T. ** $p = 0,07$

EXPERIMENTO 4: Efeito dos extratos etanólicos de folhas secas de cagaita e murici na criotolerância de blastocistos expandidos produzidos *in vitro*.

4.1 Efeito dos extratos etanólicos nas taxas de re-expansão, eclosão e degeneração embrionária pós descongelamento.

A taxa de re-expansão foi similar em todos os momentos, para todos os tratamentos ($p > 0,05$). Já a taxa de eclosão diferiu entre os grupos a partir do momento 24 horas, onde o grupo controle fresco mostrou taxas maiores do que os GDT e o G5% ($p < 0,05$) e taxas similares aos grupos suplementados com os extratos. Nos momentos 36 e 48 horas de avaliação, o grupo controle fresco demonstrou melhores taxas de eclosão em relação aos demais. No entanto, entre os grupos criopreservados, o Cag0,01 teve maior taxa de eclosão em relação ao GDT ($p > 0,05$). Os demais grupos criopreservados foram similares entre si. Ao avaliar a taxa de

degeneração no momento 12 horas, o GDT apresentou as maiores taxas em relação a todos os outros grupos ($p < 0,05$). Nos demais momentos avaliados (24, 36 e 48 horas), o grupo controle fresco manteve a menor taxa de degeneração. Dentre os grupos criopreservados, o Cag0,01 mostrou menores taxas de degeneração no momento 24 horas. No entanto, esse resultado não foi observado nos momentos 36 e 48 horas, no qual o Cag0,01 foi similar a todos os grupos submetidos à criopreservação ($p > 0,05$), conforme demonstra a figura 12.

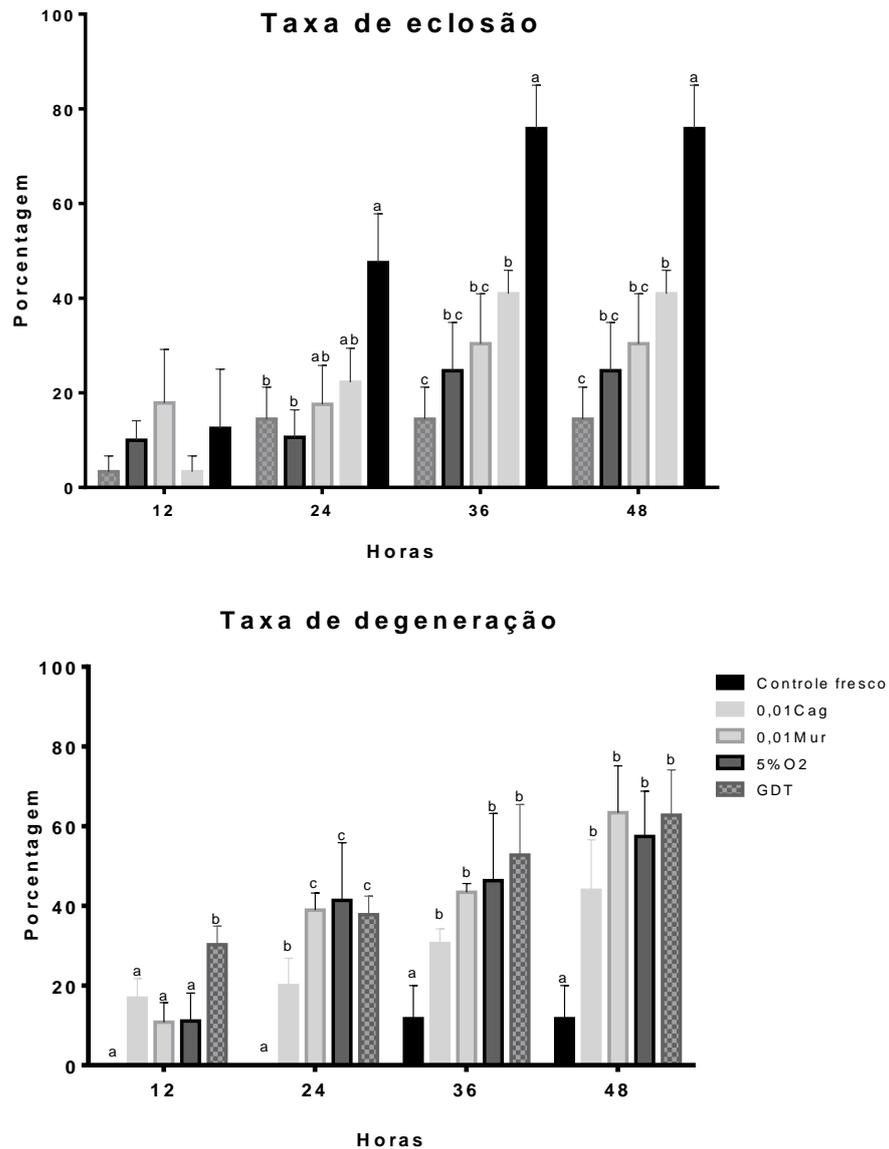


Figura 12: Taxas de eclosão e degeneração em 12, 24, 36 e 48 horas após descongelamento de blastocistos expandidos congelados pelo método DT (direct transfer) sob diferentes sistemas de cultivo 20% de O₂ (sem a adição de extrato etanólico: GDT); com a adição de 0,01mg/mL de extrato etanólico de folhas secas de cagaita (Cag0,01) ou de murici (Mur0,01) e 5% de O₂ (G5%) e grupo controle não criopreservados (Controle fresco). Letras distintas, no mesmo horário avaliado, diferem entre si ($p < 0,05$).

4.2 Efeito dos extratos etanólicos na produção de espécies reativas de oxigênio e taxa de apoptose em embriões pós descongelamento.

Foram avaliados 134 embriões para a produção de ROS, avaliação da taxa de apoptose e número total de células embrionárias. Não houve diferença ($p>0,05$) na produção de ROS entre os tratamentos. O número total de células foi maior no grupo controle fresco em relação aos demais grupos. Contudo, a proporção de células apoptóticas foi significativamente maior no GDT ($p>0,05$) quando comparados aos tratamentos submetidos ao congelamento e ao grupo controle fresco, conforme demonstra a figura 13.

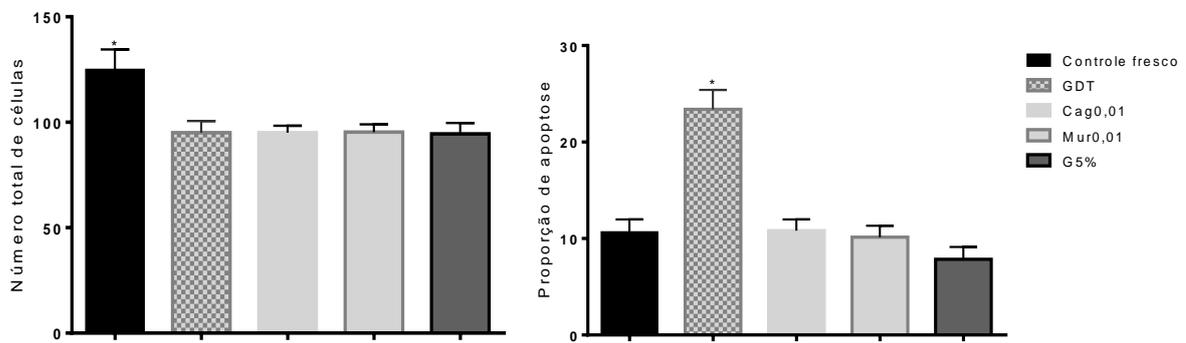


Figura 13: Número total de células e taxa de células apoptóticas de blastocistos expandidos bovinos cultivados *in vitro* (porcentagem \pm erro padrão) sob diferentes sistemas de cultivo 20% de O_2 (sem a adição de extrato etanólico: GDT); com a adição de 0,01mg/mL de extrato etanólico de folhas secas de cagaita (Cag0,01) ou de murici (Mur0,01) e 5% de O_2 (G5%) e grupo controle não criopreservados (Controle fresco), submetidos ao processo de criopreservação pelo método de transferência direta (DT), descongelados e cultivados por 12 horas.

*Grupo diferiu significativamente dos demais ($p<0,05$).

6. DISCUSSÃO

A busca por compostos naturais com alta atividade antioxidante como alternativa para o incremento da qualidade embrionária é crescente entre os grupos de pesquisa (BURDA e OLESZEK 2001, HIGDON e FREI 2003, ARTS e HOLLMAN 2005, SPINACI et al. 2008, KWAK et al. 2012, WANG et al. 2013, MUKHERJEE et al. 2014, KANG et al. 2016, DO et al. 2017). Nesse contexto, o bioma cerrado, caracterizado pela grande biodiversidade, torna-se uma fonte potencial para obtenção desses compostos. Isso porque pesquisas de caracterização molecular de plantas do cerrado têm mostrado que essas possuem ampla variedade e altas concentrações desses compostos fenólicos, com comprovada ação antioxidante, além de atividades neuro protetoras, anti-inflamatórias, antiparasitárias e antifúngicas (RUFINO et al. 2009, SIQUEIRA et al. 2013, AMARAL et al. 2014, TAKAO et al. 2015, BAPTISTA et al. 2018, DE OLIVEIRA et al. 2018). Considerando desse cenário, foi levantada a hipótese de que a suplementação de extratos etanólicos de plantas do cerrado melhoraria a criotolerância de embriões PIVE. As plantas utilizadas para testar essa hipótese foram escolhidas com base em estudos anteriores (COSTA et al. 2000, RUFINO et al. 2009, CORREIA et al. 2016, BAPTISTA et al. 2018), as quais mostraram propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antifúngicas.

Nessa primeira etapa, essas cinco plantas foram comparadas quanto à atividade antioxidante e ao teor de compostos fenólicos. Os extratos das folhas que apresentaram melhores índices com relação a esses dois parâmetros foram do murici e da cagaita. O murici mostrou valores superiores aos relatados por Silva et al (2007), quando analisaram extratos de folhas secas dessa planta colhidas no estado do Pará, para ambos os parâmetros. Já os resultados da folha da cagaita foram inferiores quando comparados à concentração de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante obtidos por Takao et al (2015), colhidas no estado de São Paulo. Tais diferenças entre as espécies de plantas já são esperadas, assim como são esperadas variações nas concentrações e nos tipos de polifenóis na mesma planta, dependendo do material biológico analisado (folhas, frutos, casca) e da região onde se localizam as plantas (NAVARRO

HOYOS et al. 2015). Ainda, os teores de compostos fenólicos e a atividade antioxidante podem sofrer variações na mesma planta, dependendo da época do ano em que o material é coletado (CEZAROTTO et al. 2017). Com base nos resultados obtidos no primeiro experimento, os extratos de murici e cagaita foram selecionados para serem adicionados no sistema *in vitro* para produção de embriões bovinos.

Como não há relatos na literatura que avaliam o uso desses compostos para a produção *in vitro* de embriões, foi necessário estabelecer as melhores concentrações antes de adicioná-las aos meios de cultivo. Várias concentrações de cada extrato das plantas foram testadas. A maior concentração de extrato de cagaita (Cag1) testada foi prejudicial aos embriões. Este efeito foi evidenciado pela menor taxa de blastocistos produzida e pelo atraso na velocidade de desenvolvimento embrionário, em D7, do grupo Cag1 em comparação com o grupo Cag0,01. Já o extrato de murici, na mesma concentração de 1 mg/mL (Mur1), inibiu completamente o desenvolvimento embrionário. No entanto, é importante ressaltar que o efeito deletério só foi observado quando altas concentrações foram utilizadas. Quando a concentração do extrato diminuiu, esse efeito não foi mais detectado.

Sabe-se que as espécies reativas de oxigênio atuam como um segundo mensageiro em muitos sistemas metabólicos vitais para a célula, como transporte de proteínas e regulação da atividade transcricional (SIES 2014, SIES 2017, TAVERNE et al. 2018). No entanto, enquanto baixos níveis de ROS estimulam a proliferação celular, altos níveis podem resultar em ação citotóxica (HALLIWELL e GUTTERIDGE 2015, JONES e SIES 2015). Portanto, é possível que o efeito deletério observado quando altas concentrações foram utilizadas seja resultado da alta atividade antioxidante dos extratos. Isso pode ter diminuído substancialmente a produção de ROS no início do desenvolvimento embrionário, prejudicando a sinalização intracelular no zigoto. Essa hipótese foi reforçada pela análise do meio de cultivo suplementado com 1 mg/mL de murici (Mur1), que apresentou alta atividade antioxidante, mesmo após sete dias de cultivo. A persistência de alta atividade antioxidante por sete dias pode ter prejudicado o desenvolvimento embrionário do grupo Mur1 e, até certo ponto, o desenvolvimento no grupo Mur0,1

Por outro lado, as menores concentrações de extrato não afetaram as taxas de blastocistos nem a cinética de desenvolvimento embrionário, mas influenciaram a taxa de apoptose. Apesar de a apoptose ser considerada um processo fisiológico em embriões pré-implantacionais, uma alta incidência de células apoptóticas está correlacionada com anormalidades morfológicas em embriões (HARDY et al. 1989, BETTS e KING 2001,

VANDAELE et al. 2006). A suplementação de 0,01 mg/mL de cagaita diminuiu a taxa de apoptose em relação às demais concentrações, o que pode ser um indicativo de melhor qualidade. Esse efeito dose-resposta, que mostra toxicidade em concentrações mais altas e melhora na qualidade do embrião quando cultivado em concentrações mais baixas, já foi descrito anteriormente (WANG et al. 2007, WANG et al. 2013, DO et al. 2017).

Após a escolha da concentração mais adequada (0,01 mg/mL de cada extrato), a produção embrionária e os níveis intracelulares de ROS e GSH foram avaliados. A presença dos extratos no meio de cultivo ou do sistema em baixa tensão de O₂ (G5%) não afetou a produção nem o desenvolvimento embrionário. Da mesma forma, os extratos não tiveram efeito sobre os níveis intracelulares de ROS e GSH. Surpreendentemente, o cultivo sob baixa tensão de O₂ não afetou os níveis de ROS ou GSH. Segundo Leite et al. (2017) e outros pesquisadores (WALE e GARDNER 2016, MA et al. 2017, SCIORIO e SMITH 2019), a produção de ROS em embriões cultivados sob baixa tensão de oxigênio é menor em comparação com embriões cultivados sob concentrações atmosféricas de O₂. Uma explicação plausível, embora não definitiva, pode ser que os níveis de transcritos dos genes envolvidos no metabolismo de ROS, que foram semelhantes entre os grupos, podem não ter contribuído para a eliminação da ROS desse grupo. Sabe-se que a produção de ROS é regulada por um sistema antioxidante enzimático, como enzimas da família superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase e um sistema não enzimático, como a glutathione (HALLIWELL e GUTTERIDGE 2015). Nossos resultados mostraram que a suplementação de embriões com extratos etanólicos de cagaita e murici não afetou os níveis de ROS e GSH dos blastocistos expandidos; isso também é verdade nos relatos de Rocha-Frigoni et al. (2014), Anjos et al. (2019) e Madrid Gaviria et al. (2019).

Os resultados da avaliação da expressão gênica em relação ao estresse oxidativo celular mostraram que a suplementação do meio de cultivo com o extrato não teve efeito na produção de GSH; isso pode ter influenciado o mecanismo de eliminação do ROS, tornando-o menos eficiente. Além disso, não foi observado um aumento nos níveis de transcritos de SOD2 e CAT, os quais poderiam ter contribuído para a redução de ROS. No entanto, apesar do nível de transcritos do GPX4 ser significativamente maior nos grupos suplementados com os extratos, isso não foi suficiente para diminuir a concentração de ROS detectada. Porém, a ação da proteína codificada por esse gene não se restringe ao metabolismo da ROS. Ela atua, também, na regulação da apoptose celular, pois pode neutralizar a atividade da lipoxigenase 12/15 (enzima responsável pela ativação do fator indutor de apoptose) uma via alternativa para apoptose além das caspases (SEILER et al. 2008). Esse aumento nos níveis de transcritos de

GPX4 parece ter contribuído para a diminuição da taxa de apoptose nos embriões cultivados com extratos de cagaita e murici, uma vez que os demais genes indutores de apoptose avaliados (CASP3 e CASP8) não foram expressos diferencialmente entre os tratamentos. Além disso, a adição desses extratos não alterou o nível de transcrição de genes-chave no mecanismo regulador da apoptose, como o BAX (pró-apoptótico) e o BCL2-L1 (anti-apoptótico) nos blastocistos expandidos. Alguns autores já relataram um comportamento semelhante nesses genes em embriões suplementados com resveratrol durante o cultivo *in vitro* (TORRES et al. 2018, MADRID GAVIRIA et al. 2019). Estes resultados mostram uma possível ação anti-apoptótica dos extratos etanólicos de cagaita e murici através do aumento dos níveis de transcritos de GPX4 e não por outras vias metabólicas envolvidas no complexo mecanismo de apoptose.

Além dos parâmetros já citados, também foi avaliada a capacidade dos embriões de responder à criopreservação. É bem aceito que a criotolerância é um marcador altamente confiável de qualidade embrionária (IMAI et al. 2002, LONERGAN et al. 2003, RIZOS et al. 2003). Nesse sentido, demonstramos claramente uma redução significativa nas taxas de apoptose e degeneração 12 horas após o descongelamento em embriões cultivados na presença de extratos de cagaita e murici ou quando cultivados em tensão de 5% de O₂. Esse aumento na criotolerância, causado pela adição de extratos de cagaita e murici, é semelhante ao descrito por Zullo et al. (2016); isso pode ser explicado pela alta capacidade antioxidante, a qual protege o embrião do estresse oxidativo causado pelo processo de congelamento e descongelamento e evita uma possível peroxidação lipídica, lesão de membrana e outros danos estruturais. Por outro lado, os benefícios da baixa tensão de oxigênio, durante o cultivo, na qualidade embrionária foram descritos anteriormente (TAKAHASHI et al. 2000, GUERIN et al. 2001, KITAGAWA et al. 2004). No entanto, esse efeito positivo da criotolerância nem sempre é relatado (ROCHA-FRIGONI et al. 2015). Nossos resultados mostraram uma melhora na criotolerância de embriões cultivados sob baixa tensão, mas os benefícios da suplementação de extrato, especialmente cagaita a 0,01 mg / mL, mostraram-se mais eficientes que os demais, tanto em termos de taxa de degeneração quanto de eclosão.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou, pela primeira vez, os efeitos dos extratos etanólicos das folhas secas de cagaita e murici na melhoria da criotolerância dos blastocistos bovinos produzidos *in vitro*. No entanto, mais estudos são necessários para avaliar outras vias antioxidantes e apoptóticas, bem como para avaliar o efeito de embriões cultivados com os extratos nas taxas de gestação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelrazik, H., R. Sharma, R. Mahfouz and A. Agarwal (2009). "L-carnitine decreases DNA damage and improves the in vitro blastocyst development rate in mouse embryos." Fertil Steril **91**(2): 589-596.

Abe, T., R. Kawahara-Miki, T. Hara, T. Noguchi, T. Hayashi, K. Shirasuna, T. Kuwayama and H. Iwata (2017). "Modification of mitochondrial function, cytoplasmic lipid content and cryosensitivity of bovine embryos by resveratrol." J Reprod Dev **63**(5): 455-461.

Agarwal, A. and S. S. Allamaneni (2004). "Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction." Reprod Biomed Online **9**(3): 338-347.

Agarwal, A., D. Durairajanayagam and S. S. du Plessis (2014). "Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review." Reprod Biol Endocrinol **12**: 112.

Agarwal, A., T. M. Said, M. A. Bedaiwy, J. Banerjee and J. G. Alvarez (2006). "Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting." Fertil Steril **86**(3): 503-512.

Ali, A. A., J. F. Bilodeau and M. A. Sirard (2003). "Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development." Theriogenology **59**(3-4): 939-949.

Amaral, L. F., P. Moriel, M. A. Foglio and P. G. Mazzola (2014). "Caryocar brasiliense supercritical CO2 extract possesses antimicrobial and antioxidant properties useful for personal care products." BMC Complement Altern Med **14**: 73.

Andrade, G. M., M. M. Bomfim, M. Del Collado, F. V. Meirelles and F. Perecin (2019). "Oxygen tension modulates extracellular vesicles and its miRNA contents in bovine embryo culture medium." **86**(8): 1067-1080.

Arama, E. and H. Steller (2006). "Detection of apoptosis by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling and acridine orange in *Drosophila* embryos and adult male gonads." Nat Protoc **1**(4): 1725-1731.

Arts, I. C. and P. C. Hollman (2005). "Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies." Am J Clin Nutr **81**(1 Suppl): 317S-325S.

Baptista, A., R. V. Gonçalves, J. Bressan and M. d. C. G. Pelúzio (2018). "Antioxidant and Antimicrobial Activities of Crude Extracts and Fractions of Cashew (*Anacardium occidentale* L.), Cajui (*Anacardium microcarpum*), and Pequi (*Caryocar brasiliense* C.): A Systematic Review." *Oxidative medicine and cellular longevity* **2018**: 3753562-3753562.

Beyer, R. E. (1992). "An analysis of the role of coenzyme Q in free radical generation and as an antioxidant." *Biochem Cell Biol* **70**(6): 390-403.

Bo, G. A. and R. J. Mapletoft (2013). "Evaluation and classification of bovine embryos." *Animal Reproduction* **10**(3): 344-348.

Bomfim, M. M., G. M. Andrade, M. Del Collado, J. R. Sangalli, P. K. Fontes, M. F. G. Nogueira, F. V. Meirelles and J. C. da Silveira (2017). "Antioxidant responses and deregulation of epigenetic writers and erasers link oxidative stress and DNA methylation in bovine blastocysts." **84**(12): 1296-1305.

Bravo, L. (1998). "Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance." *Nutr Rev* **56**(11): 317-333.

Burda, S. and W. Oleszek (2001). "Antioxidant and antiradical activities of flavonoids." *J Agric Food Chem* **49**(6): 2774-2779.

Caamano, J. N., Z. Y. Ryoo, J. A. Thomas and C. R. Youngs (1996). "beta-mercaptoethanol enhances blastocyst formation rate of bovine in vitro-matured/in vitro-fertilized embryos." *Biology of reproduction* **55**(5): 1179-1184.

Casslen, B. G. (1987). "Free amino acids in human uterine fluid. Possible role of high taurine concentration." *J Reprod Med* **32**(3): 181-184.

Castillo-Martin, M., S. Bonet, R. Morato and M. Yeste (2014). "Supplementing culture and vitrification-warming media with l-ascorbic acid enhances survival rates and redox status of IVP porcine blastocysts via induction of GPX1 and SOD1 expression." *Cryobiology* **68**(3): 451-458.

Cezarotto, V. S., S. R. Giacomelli, M. H. Vendruscolo, A. S. Vestena, C. S. Cezarotto, R. C. da Cruz, L. H. Maurer, L. M. Ferreira, T. Emanuelli and L. Cruz (2017). "Influence of Harvest Season and Cultivar on the Variation of Phenolic Compounds Composition and Antioxidant Properties in *Vaccinium ashei* Leaves." *Molecules (Basel, Switzerland)* **22**(10): 1603.

Chae, H. Z., H. J. Kim, S. W. Kang and S. G. Rhee (1999). "Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin." *Diabetes Res Clin Pract* **45**(2-3): 101-112.

Correa, G. A., R. Rumpf, T. C. Mundim, M. M. Franco and M. A. Dode (2008). "Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress." *Anim Reprod Sci* **104**(2-4): 132-142.

Correia, A. F., D. Silveira, Y. M. Fonseca-Bazzo, P. O. Magalhaes, C. W. Fagg, E. C. da Silva, S. M. Gomes, L. Gandolfi, R. Pratesi and Y. K. de Medeiros Nobrega (2016). "Activity of crude

extracts from Brazilian cerrado plants against clinically relevant *Candida* species." BMC Complement Altern Med **16**: 203.

Costa, T. R., O. F. Fernandes, S. C. Santos, C. M. Oliveira, L. M. Liao, P. H. Ferri, J. R. Paula, H. D. Ferreira, B. H. Sales and M. d. R. Silva (2000). "Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil." J Ethnopharmacol **72**(1-2): 111-117.

Cruz, M. H., C. L. Leal, J. F. da Cruz, D. X. Tan and R. J. Reiter (2014). "Role of melatonin on production and preservation of gametes and embryos: a brief review." Anim Reprod Sci **145**(3-4): 150-160.

de Matos, D. G. and C. C. Furnus (2000). "The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine." Theriogenology **53**(3): 761-771.

de Matos, D. G., B. Gasparini, S. R. Pasqualini and J. G. Thompson (2002). "Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content." Theriogenology **57**(5): 1443-1451.

de Matos, D. G., C. Herrera, R. Cortvrindt, J. Smitz, A. Van Soom, D. Nogueira and R. S. Pasqualini (2002). "Cysteamine supplementation during in vitro maturation and embryo culture: a useful tool for increasing the efficiency of bovine in vitro embryo production." Mol Reprod Dev **62**(2): 203-209.

de Oliveira, T. S., D. V. Thomaz, H. F. da Silva Neri, L. B. Cerqueira, L. F. Garcia, H. P. V. Gil, R. Pontarolo, F. R. Campos, E. A. Costa, F. C. A. Dos Santos, E. de Souza Gil and P. C. Ghedini (2018). "Neuroprotective Effect of *Caryocar brasiliense* Camb. Leaves Is Associated with Anticholinesterase and Antioxidant Properties." Oxidative medicine and cellular longevity **2018**: 9842908-9842908.

Do, G. Y., J. W. Kim, H. J. Park, S. B. Yoon, J. Y. Park, S. G. Yang, B. D. Jung, Y. S. Kwon, M. J. Kang, B. S. Song, S. U. Kim, K. T. Chang and D. B. Koo (2017). "Native plants (*Phellodendron amurense* and *Humulus japonicus*) extracts act as antioxidants to support developmental competence of bovine blastocysts." Asian-Australas J Anim Sci **30**(9): 1245-1252.

Dokmeci, D. (2005). "Oxidative stress, male infertility and the role of carnitines." Folia Med (Plovdiv) **47**(1): 26-30.

Dormandy, T. L. (1980). "Free-radical reaction in biological systems." Annals of the Royal College of Surgeons of England **62**(3): 188-194.

Dumoulin, J. C., J. L. Evers, J. A. Bakker, M. Bras, M. H. Pieters and J. P. Geraedts (1992). "Temporal effects of taurine on mouse preimplantation development in vitro." Hum Reprod **7**(3): 403-407.

Dumoulin, J. C., L. C. van Wissen, P. P. Menheere, A. H. Michiels, J. P. Geraedts and J. L. Evers (1997). "Taurine acts as an osmolyte in human and mouse oocytes and embryos." Biol Reprod **56**(3): 739-744.

Dunning, K. R. and R. L. Robker (2012). "Promoting lipid utilization with l-carnitine to improve oocyte quality." Anim Reprod Sci **134**(1-2): 69-75.

Evans, P. and B. Halliwell (1999). "Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria." Annals of the New York Academy of Sciences **884**: 19-40.

Fidelis, A. A. G.; Leme, L. O.; Ramiro Jr. E.; Leme, A.; Rumpf, R.; Franco, M. M. (2014). "Antioxidantes associados à pressão hidrostática sobre a viabilidade embrionária pós desvitrificação." Revista Brasileira de Reprodução Animal **38**: 60-66.

Firth, C. A. and S. P. Gieseg (2007). "Redistribution of metal ions to control low density lipoprotein oxidation in Ham's F10 medium." Free Radic Res **41**(10): 1109-1115.

Fischer, B. and B. D. Bavister (1993). "Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits." Journal of reproduction and fertility **99**(2): 673-679.

Giaretta, E., M. Spinaci, D. Bucci, C. Tamanini and G. Galeati (2013). "Effects of resveratrol on vitrified porcine oocytes." Oxid Med Cell Longev **2013**: 920257.

Guerin, P., J. Guillaud and Y. Menezo (1995). "Hypotaurine in spermatozoa and genital secretions and its production by oviduct epithelial cells in vitro." Hum Reprod **10**(4): 866-872.

Guimaraes, A. L., S. A. Pereira, N. R. Kussano and M. A. Dode (2016). "The effect of pre-maturation culture using phosphodiesterase type 3 inhibitor and insulin, transferrin and selenium on nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes." Zygote **24**(2): 219-229.

Gutteridge, J. M. and B. Halliwell (2000). "Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future." Ann N Y Acad Sci **899**: 136-147.

Halliwell, B. (1996). "Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation." Biochem Soc Trans **24**(4): 1023-1027.

Halliwell, B. (1996). "Mechanisms involved in the generation of free radicals." Pathol Biol (Paris) **44**(1): 6-13.

Halliwell, B. (2014). "Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: avoiding pitfalls." Biomed J **37**(3): 99-105.

Halliwell, B. and O. I. Aruoma (1991). "DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems." FEBS letters **281**(1-2): 9-19.

Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (2015). Free radicals in biology and medicine, Clarendon Press.

Halliwell, B., J. M. Gutteridge and C. E. Cross (1992). "Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?" J Lab Clin Med **119**(6): 598-620.

Hanasaki, Y., S. Ogawa and S. Fukui (1994). "The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids." Free Radic Biol Med **16**(6): 845-850.

Hannan, N. J., P. Paiva, K. L. Meehan, L. J. Rombauts, D. K. Gardner and L. A. Salamonsen (2011). "Analysis of fertility-related soluble mediators in human uterine fluid identifies VEGF as a key regulator of embryo implantation." Endocrinology **152**(12): 4948-4956.

Harvey, A. J., K. L. Kind and J. G. Thompson (2002). "REDOX regulation of early embryo development." Reproduction **123**(4): 479-486.

Hayashi, T., S. Ueda, M. Mori, T. Baba, T. Abe and H. Iwata (2018). "Influence of resveratrol pretreatment on thawed bovine embryo quality and mitochondrial DNA copy number." Theriogenology **106**: 271-278.

Higdon, J. V. and B. Frei (2003). "Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions." Crit Rev Food Sci Nutr **43**(1): 89-143.

Holm, P. and H. Callesen (1998). "In vivo versus in vitro produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application." Reprod Nutr Dev **38**(6): 579-594.

Hosseini, S. M., M. Forouzanfar, M. Hajian, V. Asgari, P. Abedi, L. Hosseini, S. Ostadhosseini, F. Moulavi, M. Safahani Langroodi, H. Sadeghi, H. Bahramian, S. Eghbalsaied and M. H. Nasr-Esfahani (2009). "Antioxidant supplementation of culture medium during embryo development and/or after vitrification-warming; which is the most important?" J Assist Reprod Genet **26**(6): 355-364.

Hosseini, S. M., M. Forouzanfar, M. Hajian, V. Asgari, P. Abedi, L. Hosseini, S. Ostadhosseini, F. Moulavi, M. Safahani Langroodi, H. Sadeghi, H. Bahramian, S. Eghbalsaied and M. H. Nasr-Esfahani (2009). "Antioxidant supplementation of culture medium during embryo development and/or after vitrification-warming; which is the most important?" Journal of assisted reproduction and genetics **26**(6): 355-364.

Ishii, T., S. Bannai and Y. Sugita (1981). "Mechanism of growth stimulation of L1210 cells by 2-mercaptoethanol in vitro. Role of the mixed disulfide of 2-mercaptoethanol and cysteine." The Journal of biological chemistry **256**(23): 12387-12392.

Jang, H. H., K. O. Lee, Y. H. Chi, B. G. Jung, S. K. Park, J. H. Park, J. R. Lee, S. S. Lee, J. C. Moon, J. W. Yun, Y. O. Choi, W. Y. Kim, J. S. Kang, G. W. Cheong, D. J. Yun, S. G. Rhee, M. J. Cho and S. Y. Lee (2004). "Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function." Cell **117**(5): 625-635.

Johnson, M. H. and M. H. Nasr-Esfahani (1994). "Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos in vitro?" BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology **16**(1): 31-38.

Jones, D. P. and H. Sies (2015). "The Redox Code." Antioxid Redox Signal **23**(9): 734-746.
Kang, J. T., D. K. Kwon, S. J. Park, S. J. Kim, J. H. Moon, O. J. Koo, G. Jang and B. C. Lee (2013). "Quercetin improves the in vitro development of porcine oocytes by decreasing reactive oxygen species levels." J Vet Sci **14**(1): 15-20.

Kang, J. T., J. H. Moon, J. Y. Choi, S. J. Park, S. J. Kim, I. M. Saadeldin and B. C. Lee (2016). "Effect of Antioxidant Flavonoids (Quercetin and Taxifolin) on In vitro Maturation of Porcine Oocytes." Asian-Australas J Anim Sci **29**(3): 352-358.

Khazaei, M. and F. Aghaz (2017). "Reactive Oxygen Species Generation and Use of Antioxidants during In Vitro Maturation of Oocytes." Int J Fertil Steril **11**(2): 63-70.

Kitagawa, Y., K. Suzuki, A. Yoneda and T. Watanabe (2004). "Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos." Theriogenology **62**(7): 1186-1197.

Kwak, S. S., S. A. Cheong, Y. Jeon, E. Lee, K. C. Choi, E. B. Jeung and S. H. Hyun (2012). "The effects of resveratrol on porcine oocyte in vitro maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and in vitro fertilization." Theriogenology **78**(1): 86-101.

Lapointe, J. and J. F. Bilodeau (2003). "Antioxidant defenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle." Biol Reprod **68**(4): 1157-1164.

Lapointe, S., R. Sullivan and M. A. Sirard (1998). "Binding of a bovine oviductal fluid catalase to mammalian spermatozoa." Biol Reprod **58**(3): 747-753.

Lazze, M. C., R. Pizzala, M. Savio, L. A. Stivala, E. Prospero and L. Bianchi (2003). "Anthocyanins protect against DNA damage induced by tert-butyl-hydroperoxide in rat smooth muscle and hepatoma cells." Mutat Res **535**(1): 103-115.

Leopoldini, M., N. Russo, S. Chiodo and M. Toscano (2006). "Iron chelation by the powerful antioxidant flavonoid quercetin." J Agric Food Chem **54**(17): 6343-6351.

Leopoldini, M. R., N.; Toscano, M. (2011). "The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants." Food Chemistry **125**: 19.

Levy, R. R., H. Cordonier, J. C. Czyba and J. F. Guerin (2001). "Apoptosis in preimplantation mammalian embryo and genetics." Ital J Anat Embryol **106**(2 Suppl 2): 101-108.

Li, J., R. H. Foote and M. Simkin (1993). "Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase, taurine, or superoxide dismutase." Biol Reprod **49**(1): 33-37.

Li, W., K. Goossens, M. Van Poucke, K. Forier, K. Braeckmans, A. Van Soom and L. J. Peelman (2016). "High oxygen tension increases global methylation in bovine 4-cell embryos and blastocysts but does not affect general retrotransposon expression." Reprod Fertil Dev **28**(7): 948-959.

Limaye, P. V., N. Raghuram and S. Sivakami (2003). "Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats." Mol Cell Biochem **243**(1-2): 147-152.

Lindenbaum, A. (1973). "A survey of naturally occurring chelating ligands." Adv Exp Med Biol **40**: 67-77.

Liu, L., J. R. Trimarchi, P. Navarro, M. A. Blasco and D. L. Keefe (2003). "Oxidative stress contributes to arsenic-induced telomere attrition, chromosome instability, and apoptosis." The Journal of biological chemistry **278**(34): 31998-32004.

Lledias, F., P. Rangel and W. Hansberg (1998). "Oxidation of catalase by singlet oxygen." J Biol Chem **273**(17): 10630-10637.

Longobardi, V., G. Zullo, A. Salzano, C. De Canditiis, A. Cammarano, L. De Luise, M. V. Puzio, G. Neglia and B. Gasparini (2017). "Resveratrol prevents capacitation-like changes and improves in vitro fertilizing capability of buffalo frozen-thawed sperm." Theriogenology **88**: 1-8.

Luberda, Z. (2005). "The role of glutathione in mammalian gametes." Reproductive biology **5**(1): 5-17.

Machado, G. M., J. O. Carvalho, E. S. Filho, E. S. Caixeta, M. M. Franco, R. Rumpf and M. A. Dode (2009). "Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos." Theriogenology **71**(8): 1289-1297.

Madrid Gaviria, S., A. Lopez Herrera, R. Urrego, G. Restrepo Betancur and J. J. Echeverri Zuluaga (2019). "Effect of resveratrol on vitrified in vitro produced bovine embryos: Recovering the initial quality." Cryobiology.

Madrid Gaviria, S., S. A. Morado, A. Lopez Herrera, G. Restrepo Betancur, R. A. Urrego Alvarez, J. Echeverri Zuluaga and P. D. Cetica (2019). "Resveratrol supplementation promotes recovery of lower oxidative metabolism after vitrification and warming of in vitro-produced bovine embryos." Reprod Fertil Dev **31**(3): 521-528.

Marques, T. C., E. C. da Silva Santos, T. O. Diesel, L. O. Leme, C. F. Martins, M. Dode, B. G. Alves, F. Costa, E. B. de Oliveira and M. L. Gambarini (2018). "Melatonin reduces apoptotic cells, SOD2 and HSPB1 and improves the in vitro production and quality of bovine blastocysts." **53**(1): 226-236.

Mehaisen, G. M., A. M. Saeed, A. Gad, A. O. Abass, M. Arafa and A. El-Sayed (2015). "Antioxidant Capacity of Melatonin on Preimplantation Development of Fresh and Vitrified Rabbit Embryos: Morphological and Molecular Aspects." PLoS One **10**(10): e0139814.

Menezo, Y. J., E. Silvestris, B. Dale and K. Elder (2016). "Oxidative stress and alterations in DNA methylation: two sides of the same coin in reproduction." Reprod Biomed Online **33**(6): 668-683.

Merlo, B., E. Iacono, D. Bucci, M. Spinaci, G. Galeati and G. Mari (2016). "Beta-mercaptoethanol supplementation of in vitro maturation medium does not influence nuclear and cytoplasmic maturation of equine oocytes." Reprod Domest Anim **51**(6): 992-996.

Michiels, C., M. Raes, O. Toussaint and J. Remacle (1994). "Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress." Free Radic Biol Med **17**(3): 235-248.

Mishra, A., I. J. Reddy, P. S. Gupta and S. Mondal (2016). "L-carnitine Mediated Reduction in Oxidative Stress and Alteration in Transcript Level of Antioxidant Enzymes in Sheep Embryos Produced In Vitro." Reprod Domest Anim **51**(2): 311-321.

Mukherjee, A., H. Malik, A. P. Saha, A. Dubey, D. K. Singhal, S. Boateng, S. Saugandhika, S. Kumar, S. De, S. K. Guha and D. Malakar (2014). "Resveratrol treatment during goat oocytes maturation enhances developmental competence of parthenogenetic and hand-made cloned blastocysts by modulating intracellular glutathione level and embryonic gene expression." J Assist Reprod Genet **31**(2): 229-239.

Mundim, T. C., A. F. Ramos, R. Sartori, M. A. Dode, E. O. Melo, L. F. Gomes, R. Rumpf and M. M. Franco (2009). "Changes in gene expression profiles of bovine embryos produced in vitro, by natural ovulation, or hormonal superstimulation." Genet Mol Res **8**(4): 1398-1407.

Nasr-Esfahani, M., M. H. Johnson and R. J. Aitken (1990). "The effect of iron and iron chelators on the in-vitro block to development of the mouse preimplantation embryo: BAT6 a new medium for improved culture of mouse embryos in vitro." Hum Reprod **5**(8): 997-1003.

Natarajan, R., M. B. Shankar and D. Munuswamy (2010). "Effect of alpha-tocopherol supplementation on in vitro maturation of sheep oocytes and in vitro development of preimplantation sheep embryos to the blastocyst stage." J Assist Reprod Genet **27**(8): 483-490.

Navarro Hoyos, M., F. Sánchez-Patán, R. Murillo Masis, P. J. Martín-Álvarez, W. Zamora Ramirez, M. J. Monagas and B. Bartolomé (2015). "Phenolic Assesment of Uncaria tomentosa L. (Cat's Claw): Leaves, Stem, Bark and Wood Extracts." Molecules (Basel, Switzerland) **20**(12): 22703-22717.

Navarro, P. A., L. Liu, R. A. Ferriani and D. L. Keefe (2006). "Arsenite induces aberrations in meiosis that can be prevented by coadministration of N-acetylcysteine in mice." Fertility and sterility **85 Suppl 1**: 1187-1194.

Navarro, P. A., L. Liu, R. A. Ferriani and D. L. Keefe (2006). "Arsenite induces aberrations in meiosis that can be prevented by coadministration of N-acetylcysteine in mice." Fertil Steril **85 Suppl 1**: 1187-1194.

Nenadis, N., L. F. Wang, M. Tsimidou and H. Y. Zhang (2004). "Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS(*+) assay." J Agric Food Chem **52**(15): 4669-4674.

Noda, Y., H. Matsumoto, Y. Umaoka, K. Tatsumi, J. Kishi and T. Mori (1991). "Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block." Mol Reprod Dev **28**(4): 356-360.

Oh, S. J., S. P. Gong, S. T. Lee, E. J. Lee and J. M. Lim (2007). "Light intensity and wavelength during embryo manipulation are important factors for maintaining viability of preimplantation embryos in vitro." Fertil Steril **88**(4 Suppl): 1150-1157.

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

Orsi, N. M. and H. J. Leese (2001). "Protection against reactive oxygen species during mouse preimplantation embryo development: role of EDTA, oxygen tension, catalase, superoxide dismutase and pyruvate." Molecular reproduction and development **59**(1): 44-53.

Pabon, J. E., Jr., W. E. Findley and W. E. Gibbons (1989). "The toxic effect of short exposures to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development." Fertility and sterility **51**(5): 896-900.

Parrish, J. J., A. Krogenaes and J. L. Susko-Parrish (1995). "Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development." Theriogenology **44**(6): 859-869.

Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.

Raha, S., G. E. McEachern, A. T. Myint and B. H. Robinson (2000). "Superoxides from mitochondrial complex III: the role of manganese superoxide dismutase." Free Radic Biol Med **29**(2): 170-180.

Rathbun, W. B. and D. L. Murray (1991). "Age-related cysteine uptake as rate-limiting in glutathione synthesis and glutathione half-life in the cultured human lens." Experimental eye research **53**(2): 205-212.

Rayman, M. P. (2000). "The importance of selenium to human health." Lancet **356**(9225): 233-241.

Renaud, S. and M. de Lorgeril (1992). "Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease." Lancet **339**(8808): 1523-1526.

Rhee, S. G. and H. A. Woo (2011). "Multiple functions of peroxiredoxins: peroxidases, sensors and regulators of the intracellular messenger H₂O₂, and protein chaperones." Antioxid Redox Signal **15**(3): 781-794.

Rinaudo, P. and R. M. Schultz (2004). "Effects of embryo culture on global pattern of gene expression in preimplantation mouse embryos." Reproduction **128**(3): 301-311.

Rizos, D., P. Lonergan, M. P. Boland, R. Arroyo-Garcia, B. Pintado, J. de la Fuente and A. Gutierrez-Adan (2002). "Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality." Biol Reprod **66**(3): 589-595.

Rodrigues-Cunha, M. C., L. G. Mesquita, F. Bressan, M. D. Collado, J. C. Balieiro, K. R. Schwarz, F. C. de Castro, O. Y. Watanabe, Y. F. Watanabe, L. de Alencar Coelho and C. L. Leal (2016). "Effects of melatonin during IVM in defined medium on oocyte meiosis, oxidative stress, and subsequent embryo development." Theriogenology **86**(7): 1685-1694.

Rufino, M. S. M., F. A. N. Fernandes, R. E. Alves and E. S. de Brito (2009). "Free radical-scavenging behaviour of some north-east Brazilian fruits in a DPPH system." Food Chemistry **114**(2): 693-695.

- Sakatani, M., I. Suda, T. Oki, S. Kobayashi, S. Kobayashi and M. Takahashi (2007). "Effects of purple sweet potato anthocyanins on development and intracellular redox status of bovine preimplantation embryos exposed to heat shock." J Reprod Dev **53**(3): 605-614.
- Salzano, A., G. Albero, G. Zullo, G. Neglia, A. Abdel-Wahab, G. Bifulco, L. Zicarelli and B. Gasparrini (2014). "Effect of resveratrol supplementation during culture on the quality and cryotolerance of bovine in vitro produced embryos." Anim Reprod Sci **151**(3-4): 91-96.
- Sanches, B. V., P. A. Lunardelli, J. H. Tannura, B. L. Cardoso, M. H. Pereira, D. Gaitkoski, A. C. Basso, D. R. Arnold and M. M. Seneda (2016). "A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF embryos." Theriogenology **85**(6): 1147-1151.
- Saraiva, H., R. Batista, V. A. P. Alfradique, P. H. N. Pinto, L. S. Ribeiro, C. S. Oliveira, J. M. G. Souza-Fabjan, L. S. A. Camargo, J. F. Fonseca and F. Z. Brandao (2018). "l-carnitine supplementation during vitrification or warming of in vivo-produced ovine embryos does not affect embryonic survival rates, but alters CrAT and PRDX1 expression." Theriogenology **105**: 150-157.
- Shkolnik, K., A. Tadmor, S. Ben-Dor, N. Nevo, D. Galiani and N. Dekel (2011). "Reactive oxygen species are indispensable in ovulation." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(4): 1462-1467.
- Sies, H. (2017). "Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress." Redox Biol **11**: 613-619.
- Silva, E. M., J. N. S. Souza, H. Rogez, J. F. Rees and Y. Larondelle (2007). "Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region." Food Chemistry **101**(3): 1012-1018.
- Singleton, V. L., R. Orthofer and R. M. Lamuela-Raventós (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods in Enzymology, Academic Press. **299**: 152-178.
- Siqueira, E. M., F. R. Rosa, A. M. Fustinoni, L. P. de Sant'Ana and S. F. Arruda (2013). "Brazilian savanna fruits contain higher bioactive compounds content and higher antioxidant activity relative to the conventional red delicious apple." PLoS One **8**(8): e72826.
- Smith, G. D. and A. Monteiro da Rocha (2012). "Advances in embryo culture systems." Semin Reprod Med **30**(3): 214-221.
- Songsasen, N. and M. Apimeteetumrong (2002). "Effects of beta-mercaptoethanol on formation of pronuclei and developmental competence of swamp buffalo oocytes." Anim Reprod Sci **71**(3-4): 193-202.
- Sovernigo, T. C., P. R. Adona, P. S. Monzani, S. Guemra, F. Barros, F. G. Lopes and C. Leal (2017). "Effects of supplementation of medium with different antioxidants during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production." Reprod Domest Anim **52**(4): 561-569.
- Spinaci, M., S. Volpe, M. De Ambrogi, C. Tamanini and G. Galeati (2008). "Effects of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on in vitro maturation and fertilization of porcine oocytes." Theriogenology **69**(7): 877-885.

Spricigo, J. F., R. Morato, N. Arcarons, M. Yeste, M. A. Dode, M. Lopez-Bejar and T. Mogas (2017). "Assessment of the effect of adding L-carnitine and/or resveratrol to maturation medium before vitrification on in vitro-matured calf oocytes." Theriogenology **89**: 47-57.

Spyrou, G., E. Enmark, A. Miranda-Vizuette and J. Gustafsson (1997). "Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin." J Biol Chem **272**(5): 2936-2941.

Stojkovic, M., S. A. Machado, P. Stojkovic, V. Zakhartchenko, P. Hutzler, P. B. Goncalves and E. Wolf (2001). "Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture." Biol Reprod **64**(3): 904-909.

Sunderam, S., D. M. Kissin, S. B. Crawford, S. G. Folger, D. J. Jamieson, W. D. Barfield, C. Centers for Disease and Prevention (2014). "Assisted reproductive technology surveillance--United States, 2011." MMWR Surveill Summ **63**(10): 1-28.

Takahashi, M., T. Nagai, S. Hamano, M. Kuwayama, N. Okamura and A. Okano (1993). "Effect of thiol compounds on in vitro development and intracellular glutathione content of bovine embryos." Biology of reproduction **49**(2): 228-232.

Takahashi, M., T. Nagai, N. Okamura, H. Takahashi and A. Okano (2002). "Promoting effect of beta-mercaptoethanol on in vitro development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos." Biology of reproduction **66**(3): 562-567.

Takahashi, T., Y. Inaba, T. Somfai, M. Kaneda, M. Geshi, T. Nagai and N. Manabe (2013). "Supplementation of culture medium with L-carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro." Reprod Fertil Dev **25**(4): 589-599.

Takao, L. K., M. Imatomi and S. C. Gualtieri (2015). "Antioxidant activity and phenolic content of leaf infusions of Myrtaceae species from Cerrado (Brazilian Savanna)." Braz J Biol **75**(4): 948-952.

Takenaka, M., T. Horiuchi and R. Yanagimachi (2007). "Effects of light on development of mammalian zygotes." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(36): 14289-14293.

Thouas, G. A., F. Dominguez, M. P. Green, F. Vilella, C. Simon and D. K. Gardner (2015). "Soluble ligands and their receptors in human embryo development and implantation." Endocr Rev **36**(1): 92-130.

Umaoka, Y., Y. Noda, T. Nakayama, K. Narimoto, T. Mori and A. Iritani (1992). "Effect of visual light on in vitro embryonic development in the hamster." Theriogenology **38**(6): 1043-1054.

Umaoka, Y., Y. Noda, K. Narimoto and T. Mori (1992). "Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos." Molecular reproduction and development **31**(1): 28-33.

Viana, J. H. M., Figueiredo, A. C. S, Gonçalves, R. L. R, Siqueira, L. G. B (2018). "A historical perspective of embryo-related technologies in South America." Animal Reproduction **15**: 8.

- Vu, H. V., S. Lee, T. J. Acosta, S. Yoshioka, H. Abe and K. Okuda (2012). "Roles of prostaglandin F₂alpha and hydrogen peroxide in the regulation of Copper/Zinc superoxide dismutase in bovine corpus luteum and luteal endothelial cells." Reprod Biol Endocrinol **10**: 87.
- Wale, P. L. and D. K. Gardner (2010). "Time-lapse analysis of mouse embryo development in oxygen gradients." Reprod Biomed Online **21**(3): 402-410.
- Wale, P. L. and D. K. Gardner (2012). "Oxygen regulates amino acid turnover and carbohydrate uptake during the preimplantation period of mouse embryo development." Biol Reprod **87**(1): 24, 21-28.
- Wale, P. L. and D. K. Gardner (2016). "The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction." Hum Reprod Update **22**(1): 2-22.
- Wang, F., X. Tian, Y. Zhou, D. Tan, S. Zhu, Y. Dai and G. Liu (2014). "Melatonin improves the quality of in vitro produced (IVP) bovine embryos: implications for blastocyst development, cryotolerance, and modifications of relevant gene expression." PLoS One **9**(4): e93641.
- Wang, Z., C. Fu and S. Yu (2013). "Green tea polyphenols added to IVM and IVC media affect transcript abundance, apoptosis, and pregnancy rates in bovine embryos." Theriogenology **79**(1): 186-192.
- Wang, Z. G., S. D. Yu and Z. R. Xu (2007). "Effect of supplementation of green tea polyphenols on the developmental competence of bovine oocytes in vitro." Braz J Med Biol Res **40**(8): 1079-1085.
- Wang, Z. G., S. D. Yu and Z. R. Xu (2007). "Improvement in bovine embryo production in vitro by treatment with green tea polyphenols during in vitro maturation of oocytes." Anim Reprod Sci **100**(1-2): 22-31.
- Woo, H. A., S. H. Yim, D. H. Shin, D. Kang, D. Y. Yu and S. G. Rhee (2010). "Inactivation of peroxiredoxin I by phosphorylation allows localized H₂O₂ accumulation for cell signaling." Cell **140**(4): 517-528.
- Wood, Z. A., L. B. Poole and P. A. Karplus (2003). "Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling." Science **300**(5619): 650-653.
- Ye, R., S. Xu, Y. Liu, L. Pang, X. Lian, Y. Zhong, Y. Su and S. Wang (2017). "Protective Effect of Icaritin on the Development of Preimplantation Mouse Embryos against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Injury." Oxid Med Cell Longev **2017**: 2704532.
- You, J., J. Kim, J. Lim and E. Lee (2010). "Anthocyanin stimulates in vitro development of cloned pig embryos by increasing the intracellular glutathione level and inhibiting reactive oxygen species." Theriogenology **74**(5): 777-785.
- Yu, S., H. Long, Q. F. Lyu, Q. H. Zhang, Z. G. Yan, H. X. Liang, W. R. Chai, Z. Yan, Y. P. Kuang and C. Qi (2014). "Protective effect of quercetin on the development of preimplantation mouse embryos against hydrogen peroxide-induced oxidative injury." PLoS One **9**(2): e89520.

Zolini, A. M., E. Carrascal-Triana, A. Ruiz de King, P. J. Hansen, C. A. Alves Torres and J. Block (2019). "Effect of addition of l-carnitine to media for oocyte maturation and embryo culture on development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro." Theriogenology **133**: 135-143.

Zullo, G., C. De Canditiis, M. E. Pero, G. Albero, A. Salzano, G. Neglia, G. Campanile and B. Gasparri (2016). "Crocin improves the quality of in vitro-produced bovine embryos: Implications for blastocyst development, cryotolerance, and apoptosis." Theriogenology **86**(8): 1879-1885.