

Wasim Al Shebli

Efeito da Adição da Cantaxantina na Produção de Embriões bovinos *in vitro*

Garanhuns

2018

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes

Wasim Al Shebli

Efeito da Adição da Cantaxantina na Produção de Embriões bovinos *in vitro*

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

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Coutinho Bartolomeu

Co-orientador: Prof. Dr. Antônio Santana dos Santos Filho

(Garanhuns)

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Ariano Suassuna, Garanhuns - PE, Brasil

S539e

Shebli, Wasim Al

Efeito da adição de cantaxantina na produção de embriões bovinos in vitro / Wasim Al Shebli. – 2018.
39 f. : il.

Orientador: Cláudio Coutinho Bartolomeu.

Coorientador: Antônio Santana dos Santos Filho.

Dissertação (Mestrado em Sanidade e Reprodução de Ruminantes)-Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós – Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes, Garanhuns, BR - PE, 2018.

Inclui referências.

1. Bovino - Reprodução 2. Bovino – Melhoramento genético 3. Fertilização in vitro 4. Antioxidante
I. Bartolomeu, Cláudio Coutinho, orient. II. Santos Filho, Antônio Santana dos, coorient. III. Título

CDD 636.2

Universidade Federal Rural de Pernambuco
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes

Dissertação elaborada

por

Wasim Al Shebli

Aprovada em/...../.....

BANCA EXAMINADORA

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

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

.....
Dr. Antônio Santana dos Santos Filhos
Instituto Agrônômico de Pernambuco/IPA

Dedicatória.

Dedico este trabalho a Deus e ao meu pai que está observando meus passos num lugar no paraíso, a minha mãe que está orando para mim quem fez o homem que eu estou, os meus irmãos, minhas irmãs, sobrinhos e sobrinhas.

Agradecimentos.

Inicialmente agradeço a Deus que sempre me dá poder, força, esperança e fé.

Agradeço o sol da minha vida, a minha mãe quem fez o homem que eu estou.

Agradeço um caro homem de Deus, o professor Cláudio Coutinho Bartolomeu quem mudou a minha vida para outra vida ótima, me deu a chance, e abriu as portas de caminho acadêmico, e por isso eu agradeço o professor Cláudio para minha vida inteira.

Agradeço, um irmão e meu caro chefe, o professor Antônio Santana dos Santos Filhos, quem tomou minha mão e me ensinou como andar no caminho acadêmico, quem nunca cansou de procurar por mais progresso científico, e por isso eu agradeço o professor Antônio para minha vida inteira.

Agradeço o professor André Mariano Batista pelo apoio.

Agradeço o professor Júlio César Vieira de Oliveira pelo apoio.

Agradeço a minha família minhas irmãs, meus irmãos, sobrinhos e sobrinhas.

Agradeço a Universidade Federal Rural de Pernambuco, a Unidade Acadêmica de Garanhuns, e o Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes.

Agradeço a CAPES pela bolsa.

Agradeço o Brasil, e o Nordeste do Brasil, que estão meu novo país.

Agradeço quem me deu força, e coragem para ter concluído este trabalho.

Efeito da Adição da Cantaxantina na Produção de Embriões bovinos *in vitro*

Resumo.

Neste trabalho três concentrações diferentes de um antioxidante natural não enzimático (Cantaxantina) foram adicionadas ao meio de maturação *in vitro*, dois experimentos foram realizados, no primeiro experimento grupos de complexo cumulus-oócitos foram maturados de acordo com os seguintes tratamentos: Controle(C) sem adição de Cantaxantina (155 oócitos), Tratamento (T1), com adição de 1 μM de Cantaxantina (153 oócitos), Tratamento 2 (T2) com 0.5 μM de Cantaxantina (153 oócitos) e Tratamento 3 (T3) com 0.25 μM de Cantaxantina (153 oócitos), 24h após a maturação , os oócitos foram desnudados, fixados em solução contendo 3 partes de Etanol absoluto e uma parte de Ácido Glacial Acético por 48 horas em temperatura ambiente. Após a fixação, os oócitos foram colocados em uma solução de Etanol absoluto por 10 minutos e logo após foram corados com Lacmoid a 1% para visualizar os estágios de desenvolvimento nuclear. Os oócitos que mostraram o fuso de metáfase II e/ou o primeiro corpúsculo foram classificados como oócitos maturados. A taxa de maturação nuclear não mostrou diferença significativa entre os tratamentos ($P>0.05$), a porcentagem dos oócitos que atingiram à MII foi C, T₁, T₂, e T₃, 74.8%, 74.17%, 78%, e 77.9% respectivamente. Apesar de não ter sido observado diferença estatística entre os tratamentos, o Tratamento T2 apresentou maior taxa de oócitos com maturação nuclear, por esse motivo foi utilizada na segunda etapa do experimento para comparação com o grupo controle. No segundo experimento foram utilizados 118 e 113 oócitos nos grupos Controles e Tratamento, respectivamente, com o objetivo de avaliar o efeito da Cantaxantina no desenvolvimento embrionário *in vitro*. Os dados foram analisados utilizando o procedimento logstc e software (2002). Não houve diferença estatística ($P>0.05$), entre taxas de clivagem 48 horas após a fertilização *in vitro* (C:72.9%, e T₂: 76%), da mesma forma a taxa de blastocistos (C:44.9%, e T₂: 39.8%), não apresentou diferença significativa ($P>0.05$). No que concerne os estágio de desenvolvimento embrionário 168 horas após a fertilização *in vitro*, as taxas de blastocisto inicial (C:2.54 %, e T₂: 8.84%), e blastocisto (C:11 %, e T₂: 3.53%) mostraram diferença estatística ($P<0.05$), entretanto não foi observada diferença significativa ($P>0.05$), entre C, e T₂, em relação a Blastocisto expandido(17,79% e

1355%) Blastocisto eclodido (19,46% e 7.97%); os resultados deste trabalho demonstraram que a utilização da Cantaxantina no meio de maturação não incrementar a produção de embriões produzidos *in vitro*.

Palavras Chaves: Antioxidante, Taxa de Maturação Nuclear, Blastocisto.

Effect of Canthaxanthin Addition on *in vitro* Bovine Embryos Production.

Abstract.

In this work three different concentrations of a natural nonenzymatic antioxidant (Canthaxanthin) were added to *in vitro* maturation medium, the work consisted of two experiments, in the first experiment groups of oocyte-cumulus complex were matured, without Canthaxanthin, (Control Group C, 155 oocytes), with 1 μM (T_1 Group, 153 oocytes), with 0.5 μM (T_2 Group, 153 oocytes), and with 0.25 μM (T_3 Group, 153 oocytes), 24h after *in vitro* maturation, the oocytes of each group were denuded, fixed, then stained with Lacmoid 1% to visualize the oocytes' nuclei, the oocytes that showed the metaphase II spindle and/or the first polar body were classified as matured oocytes, the nuclear maturation rate did not show significant difference between the experimental groups ($P>0.05$), the percentage of the oocytes that reached the MII was C, T_1 , T_2 , and T_3 , 74.8%, 74.17%, 78%, and 77.9%, respectively, the concentration of 0.5 μM (T_2) showed the highest nuclear maturation rate among the experimental groups, so it was utilized in the second experiment. In the second experiment two groups were utilized (C, and T_2 118, and 113, respectively), to verify the effect of Canthaxanthin on the *in vitro* embryonic development, neither the cleavage rates (C:72.9%, and T_2 : 76%), nor the total blastocyst rates (C:44.9%, and T_2 : 39.8%) showed significant difference ($P>0.05$), after the classification of embryonic development stages (168 hpi), the early blastocyst rate (C:2.54 %, and T_2 : 8.84%), and the blastocyst rate (C:11 %, and T_2 : 3.53%) showed a significant differences ($P<0.05$), but the other stages did not show significant differences ($P<0.05$), (C, and T_2 , expanded blastocyst, and hatched blastocyst, 17.8%, 13.6%, and 19.5%, 8% respectively); the results of our work showed that the Canthaxanthin did not affect the nuclear maturation of the *in vitro* matured oocytes, or the *in vitro* embryo production.

Keywords: Antioxidant, nuclear maturation rate, Blastocyst.

Lista De Tabelas, e Figuras.

1. Tabela 1. a taxa de estágios desenvolvimento nuclear.....	36
2. Figura 1.....	33
3. Figura 2.....	34
4. Figura 3.....	35
5. Tabela 2 a taxa de clivagem (48 horas após a fertilização) e os estágios de blastocistos (168 horas após a fertilização).....	36

Listas de Abreviaturas, Siglas e Símbolos.

MIV..... Maturação in vitro.

FIV..... Fertilização in vitro.

CIV..... Cultivo in vitro.

IVP..... in vitro Production.

ROS..... Reactive Oxygen Species (Espécies Reativa de Oxignio).

C..... Grupo de Controle.

T1..... Grupo de Tratamento 1.

T2..... Grupo de Tratamento 2.

T3..... Grupo de Tratamento 3.

SUMÁRIO.

1. Introdução.....	12
2. Objetivo.....	14
<i>2.1. Objetivo geral.....</i>	<i>14</i>
<i>2.2. Objetivo específico.....</i>	<i>14</i>
3. Revisão de Leitura.....	15
3.1. Complexo Oócitos-Células de Cumulus (COCs).....	15
3.1.1. Oócitos Bovinos.....	15
3.1.1.1. Oogênese.....	15
3.1.1.2. Maturação dos oócitos bovinos.....	15
3.1.1.2.1. Maturação citoplasmática.....	15
3.1.1.2.2. Maturação nuclear dos oócito bovino.....	16
3.1.2. Cumulus Oophorus.....	17
3.2. O metabolismo de COCs durante a maturação.....	17
3.2.1. Mitocôndria das Células Somáticas.....	17
3.2.2. Mitocôndrias dos oócitos.....	18
3.2.3. Atividades metabólicas em COCS durante a maturação.....	18
3.2.4. Espécies Reativas de Oxigênio em complexos oócitos-células de cumulus bovinos.....	19
3.3. Fertilização.....	20
3.4. Desenvolvimento embrionário.....	21

3.5. Cantaxantina.....	22
3.5.1. O que é a Cantaxantina.....	22
3.5.2. Atividade biológica.....	22
4.Referência.....	24
5. Artigo Científico.....	28

1. Introdução:

A importância da criação de animais mais produtivos está cada vez mais evidente, e novas ferramentas que possam acelerar o melhoramento genético torna-se cada vez mais necessárias. As biotecnologias assistidas fornecem métodos rápidos e eficiente para incrementar o melhoramento genético. Entre as tecnologias reprodutivas assistidas utilizadas com maior frequência comercialmente podemos destacar a inseminação artificial (IA), a Produção *in vitro* (PIV), e a transferência de embriões (TE), que têm contribuído significativamente com a reprodução animal. No Brasil, a produção dos embriões bovinos aumentou mais do que cinco vezes utilizando a fertilização *in vitro*/cultivo que quase substituiu a superovulação como uma técnica para produção de embriões (Pereira; 2008, Junior *et al.*, 2017, Viana *et al.*, 2017). No estado do Pernambuco a seleção rápida de animais superiores geneticamente tem implica desde o ano 2016 (441000-784000, respectivamente) mostrou uma queda no número das vacas leiteiras e a produção total do leite em comparação com ano 2009 (571000- 893000, respectively) (MAPA; 2016).

Nos últimos anos a produção *in vitro* de embriões bovinos tem crescido consideravelmente, pois proporciona a vantagem de multiplicar a genética da fêmea, diferentemente do que ocorre com a Inseminação Artificial onde o a genética do macho é multiplicada de maneira difusa. Além de apresentar vantagens em relação a transferência de embriões, pois as sequelas causadas em fêmeas que recebem um elevada concentração de hormônios folículos estimulantes na TE, não acontece na PIV.

A produção *in vitro* (PIV) de embriões envolve as etapas de colheita, maturação (MIV), e fecundação *in vitro* (FIV) de oócitos bem como cultivo ou co-cultivo (CIV) de zigotos e estruturas embrionárias. além disso a PIV também permite o aprofundamento dos conhecimento relativo aos processos fisiológicos bioquímicos e biotecnológicos da espécie de interesse do estudo (Gonçalves *et al.*, 2016), Outro fato a destacar é que muitas pesquisas têm sido realizadas na PIV para estudar o efeito paterno, utilização de sêmen sexado, (Nascimento *et al.*, 2016), ou o efeito individual de touros e a eficiência da dose inseminante (Shebli *et al.*, 2017).

Entretanto a PIV ainda necessita de muitas pesquisas, pois vários fatores podem afetar as várias etapas desta biotécnica. Tal com a qualidade dos oócitos, somente 40% dos oócitos bovinos que são aspirados dos ovários de abatedouros podem atingir o estágio de ET, isso pode ser relacionado à qualidade inferior de oócitos (Yuana *et al.*, 2005), além disso o ambiente da IVM

em que a tensão utilizada de oxigênio é geralmente mais alta do que no trato reprodutivo feminino (~20% , e 3%–9% O₂, respectivamente), então na alta tensão de oxigênio, a geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) ocorre, e o suplemento do hormônio luteinizante (LH), resulta em aumento de atividades glicolíticas, e oxidação de glicose e glutathione, além disso ROS podem participar em bloque da meio no oocytes (Frigoni *et al.*, 2016, Lubarda., 2005, Cetica *et al.*, 2001). Então para melhorar a qualidade dos oócitos e embriões gerados três concentrações (1 μ M, 0.5 μ M, e 0.25 μ M) de um antioxidante natural não-enzimático (Cantaxantina) foi adicionado ao meio de MIV, neste trabalho.

2. Objetivo:

2.1. *Objetivo geral:* Estudar o efeito da adição Cantaxantina no meio da maturação em produção de embriões bovinos *in vitro*.

2.2. *Objetivo específico:*

2.2.1. Estudar o efeito da adição Cantaxantina no meio da maturação na maturação nuclear de oócitos bovinos.

2.2.2. Estudar o efeito da adição Cantaxantina no meio da maturação na taxa de clivagem.

2.2.3. Estudar o efeito da adição Cantaxantina no meio da maturação no desenvolvimento embrionário *in vitro*.

3. Revisão de Leitura:

3.1. Complexo Oócitos-Células de Cumulus (COCs).

3.1.1. Oócitos Bovinos.

3.1.1.1. Oogênese:

Os oócitos são produzidos na vida embrionária a partir das células germinativas primordiais, que se diferenciam em oogônias, passam por proliferação mitótica durante o desenvolvimento fetal, que cessa durante o período pré-antral em vacas, ovelhas e cabras. As oogônias se diferenciam em oócitos primários (2n), que começam a divisão meiótica e ficam cercados por uma camada de células da granulosa. Os oócitos são recrutados para a primeira prófase meiótica, no qual os cromossomos ficam retidos dentro do núcleo da vesícula germinativa. (Hafez e Hafez., 2003; Gordon., 2003).

3.1.1.2. Maturação dos oócitos bovinos.

A maturação nuclear principalmente envolve a segregação dos cromossomos, enquanto a maturação citoplasmática envolve a reorganização da organela e armazenamento de mRNAs, proteínas e fatores de transcrição que atuam nos processos total da maturação, fertilização e embriogênese inicial, (Ferreira *et al.*, 2009).

3.1.1.2.1. Maturação citoplasmática:

O citoplasma é crítico para assegurar programação correta de pronúcleo masculino após a fertilização, apagar e substituir as marcas epigenéticas no DNA embrionário (Roelen *et al.*, 2015). Nas 24 horas seguidas o oócito primário passa pela progressão da meiose para a metáfase II e várias mudanças na organização do seu citoplasma, que incluem rearranjo de mitocôndria, desenvolvimento continuado de armazenamento de lipídios, a redução do compartimento de Golgi, e alinhamento de granulosas corticais ao longo de oolema (Gordon., 2003; Hyttel *et al.*, 1986); os grânulos corticais são derivados de complexo de Golgi, sendo vesículas secretórias produzidas durante a oogênese, e únicos para oócitos. Os grânulos corticais são distribuídos ao longo da superfície interna perto da membrana plasmática, um padrão estrategicamente organizado para esperar pela entrada de espermatozóide e a ativação de oócito (Ferreira *et al.*, 2009.).

A produção de ribossomos ocorre na fase de VG, onde há um núcleo funcional e por isso a presença de transcrição rRNA ou produção de ribossomo para tradução de RNAm podem favorecer um maior armazenamento dessas organelas nos oócitos durante as várias etapas da maturação nuclear, (Ferreira *et al.*, 2009).

Um das funções bem conhecidas do retículo endoplasmático são enovelamento de proteínas e degradação, e metabolismo de lipídios, regulação do gradiente de íon de Ca^{+2} , e síntese da membrana, por armazenamento e liberação do cálcio, (Ferreira *et al.*, 2009).

3.1.1.2.2. Maturação nuclear dos oócito bovino.

Nos bovinos umas horas antes da ruptura do folículo e a ovulação, o oócito crescido reassume a meiose progredindo da prófase I da primeira divisão meiótica para a metáfase II da segunda divisão meiótica, culminando em uma extraordinária divisão celular, na qual a metade dos cromossomos vai para uma célula denominada oócito secundário; e os cromossomos restantes são agrupados como uma pequena bolsa de citoplasma chamada de primeiro corpúsculo polar. Essa divisão desigual do citoplasma assegura que todos os materiais essenciais sintetizados durante as fases iniciais fiquem retidos no oócito secundário. Os cromossomos do oócito secundário entram imediatamente na segunda divisão meiótica e progridem até a metáfase II; esses oócitos podem ser reativados pelos espermatozóides ou vários estímulos químicos; (Gordon., 2003; Hafez e Hafez., 2003; Hammond *et al.*, 2016).

O rompimento de vesícula germinativa (GVBD) ocorre, o que é o começo da maturação nuclear; ocorre nas primeiras 8 horas de cultivo. O fuso meiótico junta-se, e os cromossomos homólogos replicados separam a anáfase I em dois conjuntos, cada um tem uma metade do número original dos cromossomos, o oócito passa por sua primeira divisão meiótica com a expulsão do primeiro corpo polar em dentro do espaço perivitelino, depois disso o oócito vira um oócito secundário, começando a segunda divisão meiótica e progredir até atingir-se a metáfase II, (Gordon., 2003, Alberts., 2003).

3.1.2. Cumulus Oophorus.

Cumulus oophorus é um grupo de subpopulações das células da granulosa que é cercado um oócito do folículo ovariano antral, oferecendo nutriente e sinais que regulam seu crescimento e maturação, em resposta ao pico pré-ovulatório de gonadotrofina o oócito resume a meiose e as células de cumulus começam produzir o ácido hialurônico que é depósito nos espaços intracelulares e estabilizado por proteínas acessórias; este processo é chamado de expansão de cumulus. As células de cumulus são muitas importantes para o oócito para completar-se sua maturação citoplasmática, que em sua vez é necessária para adquirir a capacidade para suportar a formação de pronúcleos masculinos, fertilização mono-espermática, e desenvolvimento embrionário inicial. (Tanghe *et al.*, 2002; Hafez e Hafez 2003; Gordon., 2003).

foi encontraram que as células de cumulus em bovinos sofrem apoptose espontaneamente durante MIV, e o grau de apoptose pode ser relacionado à competência de oócitos inclusos, essa apoptose foi detectadas dificilmente nas células de cumulus no começo de MIV, mas foram evidentes ao fim de MIV (24 horas); e qual não é um fenômeno fisiológico, mas um fenômeno artificial; após MIV as células apoptóticas foram distribuídas em todas as células de cumulus, e principalmente na periferia de COCs mas não na corona radiata. (Ikeda *et al.*, 2006. Yuan *et al.*, 2005).

3.2. O metabolismo de COCs durante a maturação.

3.2.1. Mitocôndrias das células somáticas:

As mitocôndrias são organelas herdadas maternalmente que desempenham uma função essencial no metabolismo celular energético, por geração de ATP (Trifosfato de adenosina) que é necessário para muitos processos biológicos através da via de fosforilação oxidativa. As mitocôndrias exibem seu próprio material genético que é DNA mitocondrial. A atividade respiratória normal requer números adequados de genomas mitocondriais intactos e funcionais. O DNA mitocondrial é particularmente sensível ao dano oxidativo devido à sua proximidade perto de espécies reativas de oxigênio (ROS), produzidos como produtos de fosforilação oxidativa; além disso DNA mitocondrial falta de histonas protetores, tendo mecanismos

limitados de reparação de DNA propenso às replicações erradas (Hammond *et al.*, 2016; Salido *et al.*, 2009).

3.2.2. Mitocôndrias dos oócitos.

A mitocôndria desempenha um papel importante na maturação dos oócitos e subsequentemente desenvolvimento embrionário pela sua função como uma fonte estável de trifosfato de adenosina (ATP) através de fosforilação oxidativa. Nos oócitos mamíferos a atividade mitocondrial aumenta com o desenvolvimento folicular, e a mais alta atividade mitocondrial antes do reinício de meiose é associada com alta competência na maturação nuclear. As mitocôndrias são mais abundante organela no oócito; o número de mitocôndrias aumenta durante oogênese, mas o número das mitocôndrias não aumenta após a fertilização até a fase de blastocisto eclodido, além disso a mitocôndria de oócitos há somente um genoma de DNA que torna as mitocôndrias mais sensível à produção de ROS. (Hammond *et al.*, 2016; Iwata *et al.*, 2011; Stojkovic *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2011).

3.2.3. Atividades metabólicas em COCS durante a maturação.

O metabolismo de energia é crucial para a maturação de oócitos pois o progresso através todos os processos dinâmicos requer muita energia; essa energia pode ser oferecida de armazenamento interno dentro de COCs e fontes de energia externas de fluído folicular ou de meio de cultivo *in vitro* (Lazo *et al.*, 2014).

Em conceitos bioquímico e fisiológicos, a maturação do oócito pode ser dividida em duas fases uma fase indutiva e outra fase sintética, a primeira dura por 6-8 horas culmina em GVBD; nessa fase o oócito passa por reprogramação por elementos somáticos dentro do seu folículo. Na fase sintética, que dura por 18 horas, há uma restrição total dos elementos nucleares e citoplasmáticos. Após o pico pré-ovulatório de LH, os eventos da maturação começam, nas 24 horas seguidas o oócito primário passa pela progressão da meiose até metáfase II, (Gordon; 2003; Dunning *et al.*, 2014).

Os lipídios como fonte interna dos oócitos são metabolizados pela lipase, sendo os ácidos graxos mais abundantes nos oócitos bovinos imaturos são ácido palmítico e ácido oleico; (Paczkowski *et al.*, 2013; Dunning *et al.*, 2014). Os ácidos graxos gerados por lipólise são metabolizados

por β -oxidação na mitocôndria. A β -oxidação é induzida no COCs pelo pico de LH, causa um aumento transitório de AMPc que leva o começo da maturação dos oócitos. (Paczkowski *et al.*, 2013).

Os oócitos bovinos são capazes de metabolizar a glicose como fonte externa da energia, derivado de ambiente ou células de cumulus, através da glicólise, a glicose é considerada como uma fonte externa mais importante de energia metabolizada por células de cumulus (Lazo *et al.*, 2014).

As primeiras 12 horas da maturação são um ponto crítico para a maturação *in vitro* de oócitos bovinos, pois são relacionadas com a produção de ROS neste tempo (Morado *et al.*, 2009).

3.2.4. Espécies Reativas de Oxigênio em complexos oócitos-células de cumulus bovinos.

As espécies reativa de oxigênio (ROS) é uma frase usada para descrever uma variedade de moléculas e radicais livres (espécies químicas com um elétron desemparelhado) derivadas de oxigênio molecular, as ROS são produzidas no citoplasma por oxidases e mitocôndria (como uma consequência de transporte de elétron requerido para fosforilação oxidativa). A mudança em equilíbrio dentro oxidante/antioxidante em favor de oxidantes é denominada “estresse oxidativo” que resulta quando as espécies reativas de oxigênio (ROS) não são adequadamente removidas, e pode acontecer quando os antioxidantes são esgotados e/ou se a formação de ROS é aumentada ao nível mais de que a habilidade de defesa (Combelles *et al.*, 2009, Birben *et al.*, 2012, Halliwell *et al.*, 1991).

A tensão de oxigênio usada nos sistemas de MIV (maturação *in vitro*) é geralmente mais alta de que achada no microambiente de trato reprodutivo da fêmea (~20% e 3%–9% O₂, respectivamente), e nessa alta tensão ocorre a geração excessiva de ROS, especificamente peróxido de hidrogênio (H₂O₂), hidroxila radical, e peróxido radical (Frigoni *et al.*, 2016).

O estresse oxidativo exerce nas condições de cultivo *in vitro*, levando à depleção de conteúdo da glutathiona intracelular nos oócitos. A depleção de glutathiona nos oócitos pode ser um dos fatores importantes contribuídos à maturação citoplasmática e integridade estrutural incompletas de oócitos maturados *in vitro*, além disso as concentrações de glutathiona nos oócitos maturados *in vivo* são muito mais altas de que nos oócitos maturados *in vitro*. (Curnow *et al.*, 2008; Luberda., 2005).

Foi sugerido que a produção elevada de ROS pode participar na bloqueio da meiose do oócito Cetica *et al.*, (2001). A maturação *in vitro* de oócitos bovinos com suplemento de LH resultou em atividade glicolítica aumentada e oxidação de glicose e glutamina. (Gordon., 2003; Hammond *et al.*, 2016).

O sistema biológico desenvolve uns mecanismos para controlarem os níveis de ROS, incluindo agentes enzimáticos tal como superóxido dismutase, glutathione peroxidase, e catalase e outros não enzimáticas tal como α -tocoferol, ácido ascórbico, e glutathione. Os oócitos podem ser capazes de controlarem o aumento das ROS por causa de presença de seu próprio sistema enzimática antioxidante. (Cetica *et al.*, 2001).

3.3. Fertilização.

A fertilização é um processo complexo resulta em união de um espermatozóide e um oócito, sinalizando o começo de transição de oócito ao um embrião; a fertilização nos mamíferos requer três eventos críticos: (a) migração espermática entre as células de cumulus; (b) fixação espermática através da zona pelúcida e (c) fusão do espermatozóide e da membrana plasmática de óvulo, (Hafez e Hafez; 2003; Gordon; 2003).

A preparação do sêmen para FIV geralmente envolve uns processos para separar os espermatozóides de plasma seminal, e/ou diluente. O número de espermatozóides adicionados ao oócitos durante FIV afeta a taxa dos oócitos penetrados por espermatozóides e a taxa de polispermia; mas o sêmen congelado contém ambos espermatozóides viáveis ou móveis, além dos mortos quais não podem fertilizar os oócitos; mais métodos usado para a separação do sêmen bovino são Swim-Up, e Gradiente de Percoll, sendo o último mais utilizada pois a recuperação dos espermatozóides bovinos de sêmen descongelado com Gradiente de Percoll é mais do que com Swim Up (40%-9%) respectivamente, (Parrish; 2014).

Os espermatozóides capacitados passam por modificações bioquímicas quais levam a razão de acrossoma após a exposto às zona pelúcida, células de cumulus ou outras substâncias associadas com oócitos maturados *in vitro* ou *in vivo*. Na fertilização *in vitro* a heparina induz a capacitação dos espermatozóides através de sua interação com proteínas seminais do plasma (BSPs), que leva

a perda do colesterol dos espermatozoides e modula a dinâmica da membrana plasmática de espermatozoides. A adição da heparina (0.2 to 5 µg/ml) no meio da fertilização leva a penetração das maiorias dos oócitos durante 4-6 h e a formação dos pronúcleos entre 6-10h após a inseminação, (Parrish; 2014).

Uma fertilização normal depende de distribuição adequada de grânulo cortical em oócitos maduros e excitose seguida a oscilação desencadeada de cálcio no citosol por entrada de espermatozoides no oócito. Imediatamente após a fertilização, a superfície do oócito sofre modificações para impedir a penetração de espermatozoides adicionada; o bloqueio da polispermia ocorre na zona pelúcida na maioria dos mamíferos, o início do bloqueio ocorre na penetração do espermatozoide no óvulo, quando grânulos corticais são liberados dentro do espaço perivitelino. A liberação do conteúdo desses grânulos corticais provoca uma reorganização extensa da zona pelúcida e/ou da superfície vitelina (reação cortical). A reação cortical resulta em liberação de enzimas que provocam endurecimento da zona pelúcida/inativação dos receptores espermática. Na penetração da membrana vitelina pelo espermatozoide; o oócito ativado completa a meiose e expulsa o segundo corpúsculo polar dentro do espaço vitelino que marca o fim de processo da fertilização. Os cromossomos haplóides maternos remanescentes são então envolvidos por um pronúcleo. Os pronúcleos masculino e feminino migram para o centro do oócito, para rearranjarem-se no estroma citoesqueléticas do oócito após a ativação (Hafez e Hafez; 2003; Takeo *et al.*, 2014).

3.4. Desenvolvimento embrionário:

Nos oócitos mamíferos após a penetração de oócito ocorre, o primeiro ciclo celular que é caracterizado por uma duração de quase um dia em que o genoma paterno fica separado dentro do mesmo ambiente de citoplasma durante a primeira replicação de DNA (Fase-S), (Comizzoli *et al.*, 2000).

Após a ativação do genoma embrionário, que ocorre principalmente aos estágios de 8-16 células em bovinos; os embriões que falham nesse processo não podem sobreviver após ao estágio de 8-células, este fenômeno é conhecido como bloqueio de desenvolvimento. Os maiores dos zigotos bovinos param de desenvolverem ao estágio de 8 células, isso é chamado de bloqueio de

desenvolvimento sendo provavelmente relacionado com a qualidade de citoplasma do oócito, (Meirelles *et al.*, 2004).

Os embriões com desenvolvimento mais rápido têm mais alta potência de desenvolvimento quando são comparados como embriões co-cultivos com desenvolvimento mais lento; essa característica é provavelmente devido à qualidade do citoplasma de oócito, e pode ser relacionada à mais transição funcional materna zigótica (Meirelles *et al.*, 2004, Garcia *et al.*, 2015).

3.5. Cantaxantina.

3.5.1. O que é a Cantaxantina.

A cantaxantina é um pigmento que é utilizado frequentemente na alimentação, foi obtida primeiramente do fungo de *Cantharellus cibarius*, sendo um carotenóide não-pró-vitamina A, tem sido reportado que estes compostos têm atividade antioxidante tal como expulso de radicais livres. A forma química de cantaxantina é $C_{40}H_{52}O_2$, Chan *et al.*; (2009).

3.5.2. Atividade biológica:

A atividade biológica de carotenóides em mamíferos pode ser uma consequência de sua conversão aos retinóides por enzimática ou química, além disso os carotenóides têm atividade antioxidante por têmpera de oxigênio singleto ou interação com espécies de radicais peróxidos. Como os carotenóides são solúveis no lipídios, eles são transportados por lipoproteínas no plasma. Os carotenóides ligam com ambos tipos de fosfolipídios na cadeia de fosfato nos fosfolipídios hidrofílicos e nas cadeias de ácidos graxos nos fosfolípidos hidrofóbicos Nikawa *et al.*; (1995); tem sido reportado que a cantaxantina atua como antioxidante, potenciando a resposta imune, melhorar as junções comunicantes, comunicação entre as células diretamente ou através de formação de 4-oxo-ácido retinóico Huang *et al.*, (1992).

- As atividades biológicas da Cantaxantina.

A cantaxantina (0,6 μ M) supre o estresse oxidativo induzido por colesterol por uma modulação do sistema de redox e o metabolismo de colesterol Lancrajan *et al.*, (2001).

A cantaxantina foi encontrada ao alterar o estado de α -tocoferol quando foi adicionada às células

de Bal6/c murinas. As capacidades antioxidantes da cantaxantina em membranas mitocondriais de fígado porcino foram avaliadas após que as membranas foi expostas à cantaxantina por portadores de liposomal de gema de ovo contidos 0.6 μm cantaxantina, após 10 minutos a taxa de incorporação da cantaxantina aos membranas mitocondriais foi 48% Lancrajan *et al.*, (2001).

A cantaxantina (1-10 μM) não houve efeito inibitório em crescimento de linha de células de NIH-3T3 (Linhagem de células de fibroblasto de padrão) sugerindo que a cantaxantina não há efeitos tóxicos nas outras células animais normais Palozza *et al.*, (1992); a atividade biológica de cantaxantina em comunicação de célula-célula (C3H/10T1/2 fibroblasto murino), é pelo menos parcialmente devido à formação de decomposição ativas de produtos tal como ácido 4-oxo-retinóico. (Huang *et al.*, 1992).

A cantaxantina (10 e 20 μM) foi neuroprotetora via efeitos antioxidantes, e anti-inflamatórias, e melhorou a estabilidade de membrana celular e mitocondrial das células PC12 (células de Feocromocitomas murinas) *in vitro*. As células de PC12 foram preparadas com cantaxantina 10 ou 20 μM , e seguida por exposição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou íon de 1-metil-4-fenilpiridínia (MPP^+) para induzir dano celular. O tratamento pelos H_2O_2 e MPP^+ diminuiu a viabilidade celular, aumentou a liberação de lactato desidrogenase (LDH), aumentou os fragmentos de DNA, e diminuiu a potência de membrana mitocondrial. O pré-tratamento das células com cantaxantina (10 e 20 μM) dependendo da sua dose aliviou a morte celular, a liberação de LDH, os fragmentos de DNA, a redução da potência da membrana mitocondrial, o aumento de malondialdeído (MDA, indica o estresse oxidativo), e as formações de espécies reativa de oxigênio (ROS), causados por H_2O_2 e MPP^+ . O tratamento das células com H_2O_2 e MPP^+ causaram diminuição de conteúdo glutathiona, diminuição de enzima glutathiona peroxidase (GPX que protege as células de danos oxidativos), e diminuição de atividades de catalase, o pré-tratamento com cantaxantina reteve GPX e as atividades de catalase, e diminuiu as formações de MDA e ROS. O tratamento com H_2O_2 e MPP^+ significativamente diminuiu a atividade $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, e aumentou a atividade de caspase-3 e níveis de interleucina (IL-1, IL-6), e fator de necrose de tumor $\text{TNF-}\alpha$; e o pré-tratamento com cantaxantina recuperou a atividade $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, supriu a atividade de caspase-3 e a liberação de IL-1, IL-6, e $\text{TNF-}\alpha$, então a proteção pelas atividade antioxidantes e anti-inflamatória de cantaxantina foi um agente potente contra desordem neurodegenerativa Chan *et al.*, (2009).

Referência.

Alberts.B, Johnson.A, Lewis.J, Raff.M, Roberts.K, and Walter.P (2002); **Molecular Biology of the Cell, 4th edition.**

Birben.E, Sahiner.U.M, Sackesen.C,Erzurum.S, and Omer Kalayci (2012), Oxidative Stress and Antioxidant Defense, **World Allergy Organ J. 5(1): 9–19.**

Cetica.P.D, Pintos.L.N, Dalvit.G.C, Beconi.M.T (2001); Antioxidant Enzyme Activity and Oxidative Stress in Bovine Oocyte In Vitro Maturation; **IUBMB Life, 51: 57–64.**

Chan.K.C, Mong.M.C, and Yin.M.C (2009); Antioxidative and Anti-Inflammatory Neuroprotective Effects of Astaxanthin and Canthaxanthin in Nerve Growth Factor Differentiated PC12 Cells; **Journal of Food Science, Vol. 74, Nr. 7.**

Chew.B.P, Park.J.S (2004); Carotenoid action on the immune response; **J Nutr. ;134(1):257S-261S.**

Combelles.C.MH, Gupta.S, Agarwal.A (2009); Could oxidative stress influence the in-vitro maturation of oocytes? **Reprod Biomed Online. 18(6): 864–880.**

Comizzoli.P, Guienne.B.M.L, Heyman.Y, and Renard.J.P (2000); Onset of the First S-Phase Is Determined by a Paternal Effect During the G1-Phase in Bovine Zygotes; **Biology of Reproduction 62, 1677–1684.**

Cruz.M.H.C, Saraiva.N.Z, Cruz.J.F, Oliveira.C.S, Collado.M.D, Fernandes.H, Castro.F.C, Garcia.J.M (2014); Effect of follicular fluid supplementation during in vitro maturation on total cell number in bovine blastocysts produced in vitro; **R. Bras. Zootec., 43(3):120-126.**

Curnow.E. C, Ryan.J, Saunder.D and Hayes.E. S (2008); Bovine in vitro oocyte maturation as a model for manipulation of the γ -glutamyl cycle and intraoocyte glutathione; **Reproduction, Fertility and Development, 20, 579–588.**

Darzynkiewicz.Z, Galkowski.D, Zhao.H (2008); Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay; **Methods.; 44(3): 250–254.**

Dinnyés.A, Lonergan.P, Fair.T, Boland.M.P, and Yang.X (1999); Timing of the First Cleavage Post-Insemination Affects Cryosurvival of In Vitro Produced Bovine Blastocysts; **Molecular Reproduction and Development, 53:318–324.**

Dunning.K.R, Russell.D.L, Robker.R.L (2014); Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and β -oxidation; **Reproduction.;148(1):R15-27.**

Fatehi.AN , Zeinstra.C, Kooij.R.V, Colenbrander.B, Bevers. M.M (2002); Effect of cumulus cell removal of *in vitro* matured bovine oocytes prior to *in vitro* fertilization on subsequent cleavage rate; **Theriogenology Vol.57(4), 1347–1355.**

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

Fragouli.E, Wells.D (2015), Mitochondrial DNA Assessment to Determine Oocyte and Embryo Viability; **Semin Reprod Med ;33:401–409.**

Garcia.S.M, Marinho.L.S.R, Lunardelli.P.A, Seneda.M.M, Meirelles.F.V (2015), Developmental Block and Programmed Cell Death in *Bos indicus* Embryos: Effects of Protein Supplementation Source and Developmental Kinetics; **PLOS ONE, DOI:10.1371/journal.pone.0119463.**

Gilchrist.B.M, Zagalsky.P.F (1983); Isolation of a blue canthaxanthin-protein from connective tissue storage cells in *Branchinecta packardii* pearse (crustacea: anostraca) and its possible role in vitellogenesis; **Comp Biochem Physiol B. , 76 (4): 885-893.**

Gordon.I.A (2003); **Laboratory Production of Cattle Embryos., 2nd Edition.**

Guemra.S, Monzani.P.S, Santos.E.S, Zanin.R, Ohashi.O.M, Miranda.M.S, Adona.P.R (2013); Maturação *in vitro* de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário; **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.65, n.6, p.1616-1624.**

Hafez.E.S.E e Hafez.B (2003); **Reprodução Animal; Sétima Edição.**

Halliwell.B, Aruoma.O (1991); DNA damage by oxygen derived species, its mechanism and measurement in mammalian system, **Elsevier Science Publisher B.V, volume 281, number 1,2.**

Hammond.E.R , Green.M.P, Shelling.A.N, Berg.M.C, Peek.J.C, and Cree.L.M (2016); Oocyte mitochondrial deletions and heteroplasmy in a bovine model of ageing and ovarian stimulation; **Molecular Human Reproduction, Vol.22, No.4 pp. 261–271.**

Hopper R M(2017), **Bovine Reproduction., 816 p.**

Huang.D.S, Odeleye.O.E, Watson.R.R (1992); Inhibitory effects of canthaxanthin on *in vitro* growth of murine tumor cells; **Cancer Letters, Vol 65, Issue 3, P 209-213.**

Hyttel.P, Xu.K. P, Smith.S (1986); Ultrastructure of *in-vitro* oocyte maturation in cattle, **Journal of Reproduction and Fertility ;78(2):615-25.**

Ikeda.S, Saeki.K, Imai.H and Yamada.M (2006); Abilities of cumulus and granulosa cells to enhance the developmental competence of bovine oocytes during *in vitro* maturation period are

promoted by midkine; a possible implication of its apoptosis suppressing effects; **Reproduction** **132**:549–557.

Iwata.H, Goto.H, Tanaka.H, Sakaguchi.Y, Kimura.K, Kuwayama.T, Monji.Y (2011); Effect of maternal age on mitochondrial DNA copy number, ATP content and IVF outcome of bovine oocytes; **Reprod Fertil Dev.**; **23(3)**:424-32.

Lancrajan.I, Diehl.HA, Socaciu.C, Engelke.M, Kruppa.M.Z (2001); Carotenoid incorporation into natural membranes from artificial carriers: liposomes and beta-cyclodextrins; **Chem Phys Lipids.**; **112(1)**:1-10.

Lazo.L.S, Brisard.D, Elis.S, Maillard.V, Uzbekov.R, Labas.V, Desmarchais.A, Papillier.P, Monget.P, Uzbekova.S (2014); Fatty Acid Synthesis and Oxidation in Cumulus Cells Support Oocyte Maturation in Bovine; **Molecular Endocrinology** **28**: 1502–1521.

LI.G.P, Liu.Y, Bunch.T.D, White.K.L, and Aston.K.I (2005); Asymmetric Division of Spindle Microtubules and Microfilaments During Bovine Meiosis From Metaphase I to Metaphase III, **Molecular Reproduction and Development** **71**:220–226.

Li.H.J ,Liu.D.J, Cang.M, Wang.L.M, Jin.M.Z, Ma.Y.Z, Shorgan.B (2009); Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocytes; **Animal Reproduction Science** **114**:89–98.

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

Meirelles.F.V, Caetano.A.R, Watanabe.Y.F, Ripamonte.P, Carambula.S.F, Merighe.G.K, Garcia.S.M (2004); Genome activation and developmental block in bovine embryos; **Animal Reproduction Science** **82–83**:13–20.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Secretaria de Política Agrícola, Departamento de Crédito e Estudos Econômicos Coordenação-Geral de Estudos e Análises (2017); **Informativo Sobre A Estiagem No Nordeste- n 114**.

Morado.S.A, Cetica.P.D, Beconi.M.T and Dalvit.G.C (2009); Reactive oxygen species in bovine oocyte maturation *in vitro*; **Reproduction, Fertility and Development**, **21**, 608–614.

Nikawa.T, Schulz.WA, Brink. CE, Hanusch M, Saag. P, Stahl.W, Sies.H (1995); Efficacy of all-trans-beta-carotene, canthaxanthin, and all-trans-, 9-cis-, and 4-oxoretinoic acids in inducing differentiation of an F9 embryonal carcinoma RAR beta-lacZ reporter cell line; **Arch Biochem Biophys.** **1**;316(2):665-72.

Paczkowski.M, Silva.E, Schoolcraft.W.B, Krisher.R.L (2013); Comparative Importance of Fatty Acid Beta-Oxidation to Nuclear Maturation, Gene Expression, and Glucose Metabolism in Mouse, Bovine, and Porcine Cumulus Oocyte Complexes; **Biology of Reproduction** **88(5):111, 1–11.**

Palozza.P, Krinsky.N.I (1992); Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model; **Arch Biochem Biophys.** **297(2):291-5.**

Parrish.J.J. (2014); Bovine In vitro fertilization: In vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin, **Theriogenology** **1; 81(1).**

Frigoni.R.N.A.S, Leão.B.C.S, Dall'Acqua.P.C, Mingoti.G.Z (2016); Improving the cytoplasmic maturation of bovine oocytes matured in vitro with intracellular and/or extracellular antioxidants is not associated with increased rates of embryo development; **Theriogenology xxx 1–9.**

Stojkovic.M, Machado.S.A, Stojkovic.P, Zakhartchenko.V, Hutzler.P, Gonc.P.B, Wolf.A.E (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; **Biology of Reproduction** **64, 904–909.**

Takeo.S, Sato.D, Kimura.K, Monji.Y, Kuwayama.T, Miki.R.K and Iwata.H (2014); Resveratrol Improves the Mitochondrial Function and Fertilization Outcome of Bovine Oocytes, **Journal of Reproduction and Development Vol. 60, No. 2.**

Tanghe.S, Som.A.V, Nauwynck.H, Coryn.M, Kruif.A (2002); Function of The Cumulus Oophorus During Oocyte Maturation, Ovulation, and Fertilization; **Molecular Reproduction and development, Mol Reprod Dev. ;61(3):414-24.**

Yan.H, Yan.Z, Ma.Q, Jiao.F, Huang.S, Zeng.F, Zeng.Y (2011); Association between mitochondrial DNA haplotype compatibility and increased efficiency of bovine interspecies cloning; **Journal of Genetics and Genomics** **38:21-28.**

Yuana.Y.Q, Sooma.A.V, Leroya.J.L.M.R, Dewulfa.J, Zeverenb.A.V, Kruifa.A.L.J. (2005) Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. **Theriogenology**, **63(8):2147-63.**

Scientific Article.

Effect of Canthaxanthin Addition on *in vitro* bovine embryos production

Introduction:

In the state of Pernambuco-BR, in the year of 2016 the number of dairy cattle has declined to the lowest level in 7 years (drought years) [441000 (2016) -784000 (2009), respectively], but the average of dairy production did not, which has implied the importance of the selection of dairy cattle with high milk production (MAPA; 2016).

The assisted biotechnologies provide a fast and efficient methods to increase the genetic enhancement; methods such as artificial insemination (AI), *in vitro* production (IVP), and embryos transfer (ET), that are most utilized in the animal reproduction. In Brazil, the production of bovine embryos has increased more than five times using the *in vitro* fertilization/culture replacing the superovulation as a technique of embryo production. (Junior *et al.*, 2017, Pereira, 2008, Viana *et al.*, 2017).

Nowadays *in vitro* production of bovine embryos increases significantly, due to its advantages of multiplication of female's genetic characters, which is different from AI which depends on the male genetic characters; as well as the IVP provides an advantage of avoiding the consequences of superovulation in the female reproductive system due to elevated concentrations of follicle stimulating hormone (exogenous application).

The IVP consists of following steps: collection of the oocytes (ovum pick-up, or abattoir-ovaries aspiration), *in vitro* maturation (IVM), *in vitro* fertilization (IVF), and *in vitro* culture or co-culture (IVC) of zygotes and embryonic structures.

As well as the IVP can inreach our knowledges about the physiological, and biochemical phenomenons of the interested species, Gonçalves *et al.*, (2016)..

Indeed many researches of IVP have been conducted to study the paternal effect, using sexed semen, (Nascimento *et al.*, 2016), or individual paternal effect and the efficiency of insemination dose, (Shebli *et al.*, 2017).

But the IVP has been facing many challenges, because of various factors that affect the steps of this biotechnology; such as the quality of the oocytes, for instance only 40% of bovine oocytes that are aspirated from the abattoir ovaries are able to reach the stage of ET, which can be related

to the inferior quality of the oocytes, (Yuana *et al.*, 2005), moreover the tension of oxygen is generally higher in IVM system than in female reproductive tract (~20% , e 3%–9% O₂, respectively), so in the high tension of oxygen, the excessive generation of reactive oxygen species (ROS), occurs, and the supplementation of the IVM medium with luteinizing hormone (LH), leads to increase the glycolytic activities, and the oxidation of glucose and glutathione; as well as the ROS may participate in the block of meiosis in the oocytes, (Frigoni *et al.*, 2016, Luberda., 2005, Cetica *et al.*, 2001). In this work three concentrations (1 µM, 0.5 µM, and 0.25 µM) of a natural nonenzymatic antioxidant Canthaxanthin were added to *in vitro* maturation medium, aiming to improve the quality of the oocytes and embryos.

Material e Methods:

The media of washing, IVM, IVF-TALP, TALP-Semen, Percoll 9%, and SOF (Synthetic Oviductal Fluid), and mineral oil were purchased from the company of Gene Up biotechnology (Presidente Prudente-SP-Brasil), unless otherwise stated. The cryopreserved semen of a ⁵/₈ girolando bull with a history of high *in vitro* embryo production, Lacmoid powder (10 g Sigma-Aldrich), Ethanol (100%), Glacial Acid, and DMBPS (biodux®) were kindly donated by IPA. The solution of Canthaxanthin (10mg/ml saturated solution of ethanol) was kindly donated by UFRPE-Recife.

- Location of the experiment.

The experiments were conducted in the Laboratory of Animal Reproduction and Genetic Enhancement in the experimental station of the Agronomic institute of Pernambuco (IPA), in the city of Arcoverde (latitude 08°25'08" south, longitude 37°03'14" west, 663 meter altitude), semi-arid area.

- Ovaries collection.

The bovine ovaries were collected from a local slaughterhouse in the city of Arcoverde, four hours after the begin of the slaughtering, the ovaries were transported in thermos containing solution of 0,9% NaCl and 30 mg of gentamicin sulphate in the temperature of 37°C, to the laboratory (4 km of distance).

-Recuperation and Selection of the oocytes.

In the laboratory the ovaries were washed for 2-3 times with the Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DMPBS) and placed in warm bath (37°C). The COCs were aspirated from the antral follicles of 3-5 mm diameter with 18G needles that were connected to disposable 10 ml syringe, the follicular fluids were deposited in 15 ml test tube containing 5 ml of DMPBS in a warm bath. 10 minutes after the sedimentation of the COCs the supernatant was removed and 10 ml of DMBPS were added to the sediment then poured in a Petri dish (90 mm), the COCs were selected under a stereomicroscope, only the COCs of 1st degree were selected according to the number of the layers of cumulus cells and the homogeneity and the color of cytoplasm(Stojkovic et al., 2001, Jeong et al., 2009).

-In vitro maturation.

After the selection, the oocytes were washed three times in droplets of washing medium (TCM-199, HEPES, Sodium Pyruvate, 10% FCS) (100 µl), then the fourth wash was with droplet of (100 µl) IVM medium (TCM-199, Sodium Pyruvate 0,2 mM, FCS 10%, Cysteamin 0,1 mM, EGF 10 ng/mL, FSH/LH 20 µg/mL, E21 µg/mL, L-Glutamin 1 mM); according to the experimental groups (IVM without or with Canthaxanthin). Each 15-20 oocytes were matured in (100 µl) of IVM medium with or without Canthaxanthin according to each group, then the droplets were covered with mineral oil and incubated in CO₂ incubator (38.5°C, saturated humidity, 5% CO₂) for 24 hours.

- Staining of the oocytes.

24 hrs after IVM, the oocytes were denuded with peppitting in three droplets of DMBPS (100 µl) with 5% fetal bovine serum (FBS), each 5 oocytes were placed between a slide and a coverslip that were connected with vaseline, then were immersed for 36 in the solution of 3/1 volume of Ethanol (100%) and Glacial Acid for 36 hrs in the room temperature; after then the oocytes were immersed for 10 m in Ethanol (100%), and each 5 oocytes were stained with 20 µl of Lacmoid 1%, and the nuclear stage (GV, GVBD, MI, and MII) were observed under a phase-contrast microscope (*40). (Figure1, Figure 2).

- In vitro fertilization.

A 0,5 mL straw of cryopreserved semen of a $\frac{5}{8}$ girolando bull with history of high *in vitro* embryo production, was thawed in a warm path (36.5°C) for 30 seconds, then separated according to the method of discontinuous gradient of Percoll 90%, briefly the semen was deposited slowly over two layers of Percoll 45% [Percoll 90%+ TALP Semen (SPERM-TALP (base), Pyruvic solution)], and Percoll 90%, (500 μ l each layer), in 1,5 ml eppendorf tube. The first centrifugation was conducted for 7 minutes and 9400 RPM, after the removing of the supernatant, the sediment was suspended in 1 mL of IVF-TALP medium [IVF-TALP (base), Pyruvic solution 0,022 mg/mL, Heparin 1 mg/ml] then the second centrifugation was conducted as the first one. Two aliquots of 5 μ l were obtained from the sediment after the second centrifugation each one was added to 95 μ l of IVF (spermatozoa viability, and *in vitro* insemination), or distilled water (calculation of insemination dose). The number of spermatozoa were counted with the chamber of Neubauer and the insemination dose were calculated as follows: Concentration/ μ l = (Dilution Factor)(Count in 5 squares)(0.05 X 10⁶)/1000, then each 15-20 matured oocytes that were washed three times in droplets (100 μ l) of IVF-TALP medium, placed in 30 μ l of IVF-TALP medium and inseminated with 2*10⁶ spermatozoa, then the droplets were completed to 100 μ l and covered with mineral oil and incubated for 18 hrs in incubator of CO₂.

- In vitro culture.

18 hrs after the co-incubation of oocytes-spermatozoa, the presumptive zygotes were washed three times in droplets (100 μ l) of SOF (Synthetic oviductal Fluid) medium, then each group were incubated in 100 μ l of SOF medium for 168 hpi, 48 hpi the cleavage rate was observed and 168 hpi the blastocyst rate was observed and the blastocysts were classified morphologically (Early Blastocyst, Blastocyst, Expanded Blastocyst, and Hatched Blastocyst).

- Experimental design.

a- The First Experiment.

The oocytes were matured in groups as follows: Control (C) without Canthaxanthin (143 oocytes), Treatment 1 (T₁) with 1 µM of Canthaxanthin (151 oocytes), Treatment 2 (T₂) with 0.5 µM of Canthaxanthin (150 oocytes) and Treatment 3 (T₃) with 0.25 µM of Canthaxanthin (145 oocytes). After the staining with Lacmoid 1% the nuclei of the oocytes were observed under the phase-contrast microscope (40*); the oocytes were classified according to the nuclear development stage as follows: germinal vesicle (GV), germinal vesicle breakdown (GVBD), Metaphase I (MI), Metaphase II (MII) the oocytes that showed the spindle of MII and/or first polar body were classified as matured oocytes; the oocytes that did show visible nuclei (C, T₁, T₂, and T₃, 12, 2, 4, and 7 oocytes respectively) were classified as not identified (were not analysed statistically), the oocytes that showed abnormal formation of nuclei were classified as abnormal oocytes.

b- The Second Experiment.

The oocytes were matured in two experimental groups C (118 oocytes) and T₂ (113 oocytes), the cleavage rate was observed 48 hpi, and the blastocyst rate was observed 168 hpi, the blastocysts were classified morphologically as follows: Early Blastocyst, Blastocyst, Expanded Blastocyst, Hatched Blastocyst (Figure.2).

-Statistical Analysis:

The nuclear maturation rate, the other nuclear stages, cleavage rate, blastocyst rate, and the stages of blastocysts, were expressed as percentage, the results were compared with the test of Chi-squared using the software of SAS (2003), and the value of P = 0.05. In the first experiment 155, 153, 154, and 152 oocytes were matured in the groups of C, T₁, T₂, and T₃ respectively. In the second experiment 118, and 113 oocytes were matured in the groups of C, and T₂, then fertilized and cultured *in vitro*.

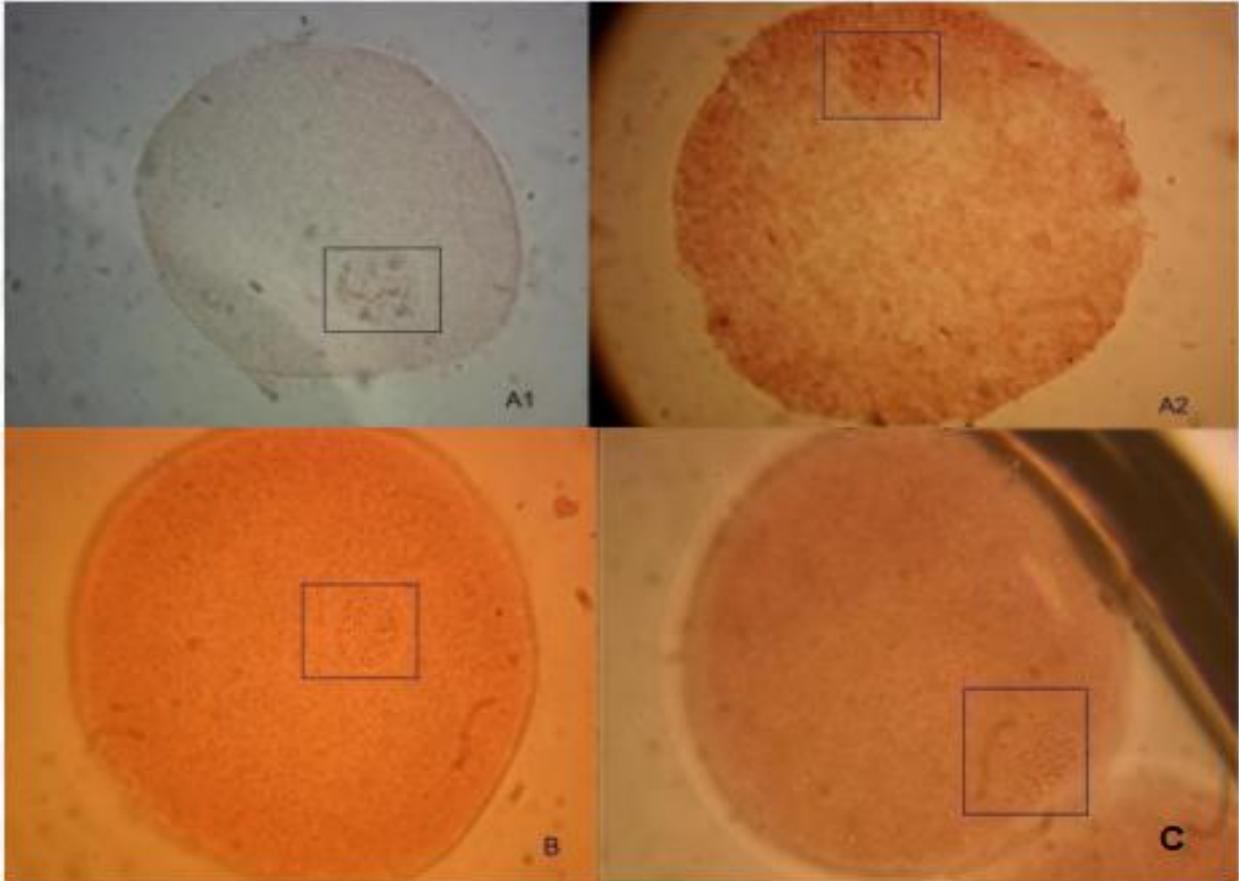


Figure.1. The nuclei of the oocytes 24 hrs after IVM (inside the squares), Lacmoid 1% staining, A1, A2: Germinal Vesicle (GV), B. Germinal Vesicle Breakdown (GVBD), C. Metaphase I (MI) (40*).



Figure.2. Matured oocyte, 24 hrs after IVM, Lactoid 1% staining, The extrusion of the first polar body, and the spindle of MII (inside the square) (40*).

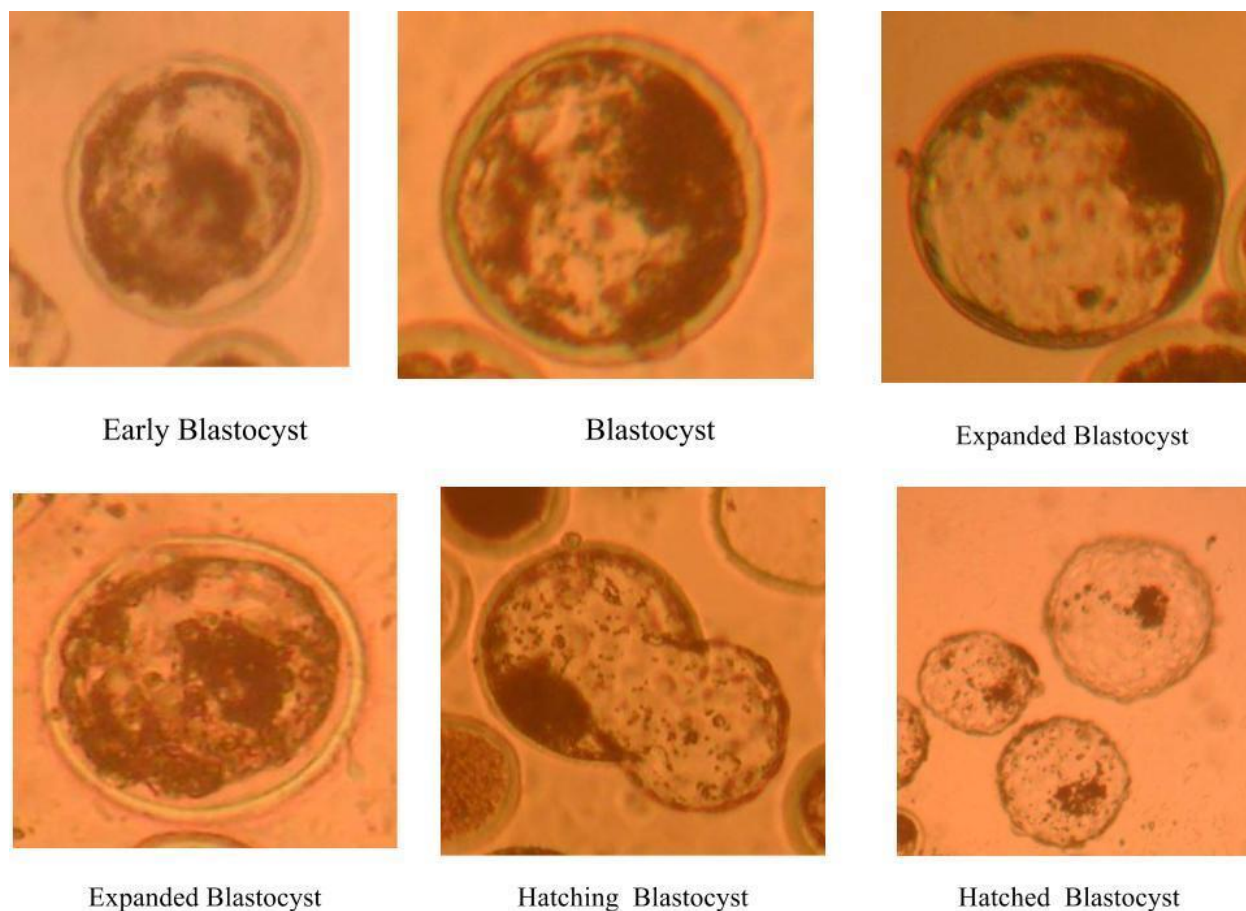


Figure.2. Embryos 168 after the insemination, the embryos were classified morphologically (40*).

- Results.

- The first experiment.

The addition of three concentrations of Canthaxanthin to the IVM medium did not show significant difference in the nuclear maturation rate (MII) ($P > 0,05$), or other nuclear development stages (GV, GVBD, and MI) ($P > 0,05$) among the experimental groups (Table 1).

Table 1. Nuclear maturation rate.

Treatment	Total N°	Fase Da Maturação Nuclear				
		Abnormal N°(%)	VG N°(%)	VGBD N°(%)	MI N°(%)	MII N°(%)
C	143	2 (1,4)a	2 (1,4)a	3 (2,09)a	29 (20,27)a	107 (74,82)a
T ₁	151	1 (0,66)a	3 (1,98)a	7 (4,63)a	28 (18,54)a	112 (74,17)a
T ₂	150	4 (2,66)a	5 (3,33)a	9 (6)a	15 (10)a	117 (78)a
T ₃	145	1 (0,69)a	1 (0,69)a	4 (2,75)a	26 (17,93)a	113 (77,93)a

No significant difference in the nuclear development stages among the experimental groups ($P>0,05$).

The oocytes in the group of T₂ showed the highest nuclear maturation rate (78%) among the experimental groups, for that reason the concentration of 0.5 μ M was used in the second experiment.

- The second experiment.

There was no significant difference in the cleavage rate, total blastocyst rate, expanded blastocyst, or hatched blastocyst, between the experimental groups ($P>0,05$). But the early blastocyst and blastocyst rates showed a significant difference between the experimental groups ($P<0,05$), the early blastocyst rate was higher in the group of T₂ than C group, and the blastocyst rate was vice versa.

Table.2. Cleavage and Blastocyst rates.

Group	Total N°	Cleavage rate	Early Blastocyst	Blastocyst	Expanded Blastocyst	Hatched Blastocyst	Total blastocyst
C	118	72,88% ^(a) (86)	2.54% ^(b) (3)	11,01% ^(b) (13)	17,79% ^(a) (21)	13,55% ^(a) (16)	44,91% ^(a) (53)
T ₂	113	76,99% ^(a) (87)	8,84% ^(b) (10)	3,53% ^(b) (4)	19,46% ^(a) (22)	7,96% ^(a) (9)	39,82% ^(a) (45)

(a) No significant difference ($P>0,05$), (b) Significant difference ($P<0,05$).

- Discussion.

- First experiment.

In this work the phases of nuclear development did not show significant difference ($P>0.05$) among the experimental groups, but the oocytes in the group of T2 showed the highest maturation rate among the experimental group, for that reason the concentration of $0.5 \mu\text{M}$ was used in the second experiment. In this work it was observed that a percentage of the nuclei was not observed after the staining with lacmoid 1%, this problem was found in other research of Sianturi *et al.*, (2002), they observed that only 85% of the nuclei were observed after the staining with lacmoid 1% and the other 15% were lost and not identified.

In this work the oocytes were matured in IVM medium with base of TCM-199 with three different concentrations of Canthaxanthin (1, 0.5, and $0.25 \mu\text{M}$), which is a natural non-enzymatic antioxidant, but the addition of Canthaxanthin did not affect the nuclear maturation rate ($P>0.05$) of bovine oocytes. The results of this work may agree with Cetica *et al.*, (2001), they confirmed that the bovine oocytes are able to control the increased concentration of ROS, due to the presence of their own antioxidant system, so probably the addition of an antioxidant to the IVM medium is not necessary to improve the nuclear maturation of bovine oocytes; which can be confirmed by other researches, for instance Takeo *et al.*, (2014) added a natural antioxidant to the IVM medium ($20 \mu\text{M}$ Resveratrol), but there was no significant difference in the nuclear maturation rate ($P>0.05$) which was observed after staining with Hoechst 33342 ($P>0.05$); other natural antioxidant (Quercetin) which was added to IVM medium by Guemra *et al.*, (2013), there was no significant difference in the nuclear maturation rate after the staining with Hoechst 33342 ($P>0.05$).

Our results showed clearly that the addition of 1, 0.5, or $0.25 \mu\text{M}$ of Canthaxanthin to IVM medium did not improve the nuclear maturation rate of bovine oocytes, however the used concentrations of Canthaxanthin did not affect the nuclear maturation rate negatively too.

- The Second Experiment.

In the second experiment there was no significant difference in the cleavage rate, total blastocyst rate, expanded blastocyst rate, or hatched blastocyst rate ($P>0.05$), between the experimental groups, but the significant differences were observed in the early blastocyst and blastocyst rates between the experimental groups; when the treatment group showed higher early blastocyst rate

than the control group ($P>0.05$), this results may have shown that the addition of of 0,5 μM of Canthaxanthin to *in vitro* maturation medium delayed the *in vitro* embryonic development; however the total blastocyst rate did not show significant difference.

Our results may agree with the results of Blondin *et al.*, (1997), they demonstrated that the determined production of ROS during IVM of bovine oocytes is required to increase the blastocyst rate. Our results showed how the addition of Canthaxanthin (0.5 μM) to the IVM medium delayed the embryonic development (early blastocyst, and blastocyst rates), but the total blastocyst, expanded blastocysts, or hatched blastocysts rates did not show significant difference ($P>0.05$); other works that added antioxidants to IVM medium showed various results; such as the work of Takeo *et al.*, (2014) did not show significant difference in the cleavage rate or total blastocyst rate after the addition of Resveratrol to IVM medium ($P>0.05$); and the work of Sovernigo *et al.*, (2016), showed that the addition of quercetin, vitamin C or resveratrol, did not show significant difference in the cleavage rate, but they claimed that the treatment groups showed higher blastocyst rates than the control group ($P > 0.05$); however in our work the addition of Canthaxanthin did not improve the *in vitro* embryonic development.

Final conclusion.

The addition of Canthaxanthin to the *in vitro* maturation medium did not improve the nuclear maturation rate of bovine oocytes or the *in vitro* bovine embryo production.

Reference.

Cetica.P.D, Pintos.L.N, Dalvit.G.C, Beconi.M.T (2001); Antioxidant Enzyme Activity and Oxidative Stress in Bovine Oocyte In Vitro Maturation; **IUBMB Life**, **51**: 57–64.

Gordon.I.A; **Laboratory Production of Cattle Embryos., 2nd Edition 2003.**

Guemra.S, MonzaniP.S, SantosE.S, Zanin.R, Ohashi.O.M, Miranda.M.S, Adona.P.R (2013); Maturação in vitro de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário; **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, **v.65, n.6, p.1616-1624.**

Hafez E. S. E., Hafez B. (2003), **Reproduction in Farm Animals, 7th edition, 509p.**

Frigoni.N.A.S, Leão.B.C.S, Dall'Acqua.P.C, Mingoti.G.Z (2016); Improving the cytoplasmic maturation of bovine oocytes matured in vitro with intracellular and/or extracellular antioxidants is not associated with increased rates of embryo development; **Theriogenology xxx (2016) 1–9.**

Jeong.W.J, Cho.S.J, Lee.H.S, Deb.G.K, Lee.Y.S, Kwon.T.H, Kong.I.K (2009); Effect of cytoplasmic lipid content on in vitro developmental efficiency of bovine IVP embryos; **Theriogenology 72:584–589.**

Stojkovic.M, Machado.S.A, Stojkovic.P, Zakhartchenko.V, Hutzler.P, Gonc.P.B, Wolf.A.E (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; **Biology of Reproduction 64, 904–909.**

Takeo.S, Sato.D, Kimura.K, Monji.Y, Kuwayama.T, Miki.R.K and Iwata.H (2014); Resveratrol Improves the Mitochondrial Function and Fertilization Outcome of Bovine Oocytes, **Journal of Reproduction and Development Vol. 60, No. 2.**

Yuana.Y.Q, Sooma.A.V, Leroya.J.L.M.R, Dewulfa.J, Zeverenb.A.V, Kruifa.A.L.J. (2005), Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. **Theriogenology; 63(8):2147-63.**