

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO – UNIFENAS
TAÍS APARECIDA PATROCÍNIO

**DESENVOLVIMENTO *in vitro* DE EMBRIÕES BOVINOS CULTIVADOS EM MEIO
COM ANÁLOGO DE RESVERATROL**

Alfenas – MG
2017

TAÍS APARECIDA PATROCÍNIO

**DESENVOLVIMENTO *in vitro* DE EMBRIÕES BOVINOS CULTIVADOS EM MEIO
COM ANÁLOGO DE RESVERATROL**

Dissertação apresentada à Universidade José do Rosário Vellano - UNIFENAS, como parte das exigências do curso de pós-graduação, para obtenção do título de Mestre em Reprodução, Sanidade e Bem-Estar Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo

Alfenas – MG
2017

Dados internacionais de catalogação-na-publicação

Biblioteca Central da UNIFENAS

Patrocínio, Taís Aparecida

Desenvolvimento in vitro de embriões bovinos cultivados em meio com análogo de resveratrol. — Taís Aparecida Patrocínio.—Alfenas, 2017.

60 f.

Orientador: Prof. Dr Luiz Sérgio de Almeida Camargo
Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-graduação
em Reprodução, Sanidade e Bem-Estar Animal -Universidade
José do Rosário Vellano, Alfenas, 2017.

1. Estresse oxidativo 2. antioxidante 3. Cultivo in vitro 4. Soro fetal
bovino I. Universidade José do Rosário Vellano II. Título

CDU : 636.082:636.2(043)

Zélia Fernandes Ferreira Miranda

Bibliotecária CRB6 1486



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: "DESENVOLVIMENTO *in vitro* DE EMBRIÕES BOVINOS CULTIVADOS EM MEIO COM ANÁLAGO DE RESVERATROL".

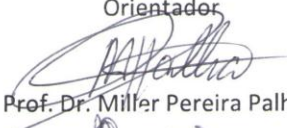
Autor: Taís Aparecida Patrocínio

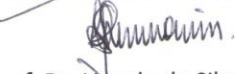
Orientador: Prof. Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM REPRODUÇÃO, SANIDADE E BEM-ESTAR ANIMAL** pela Comissão Examinadora.

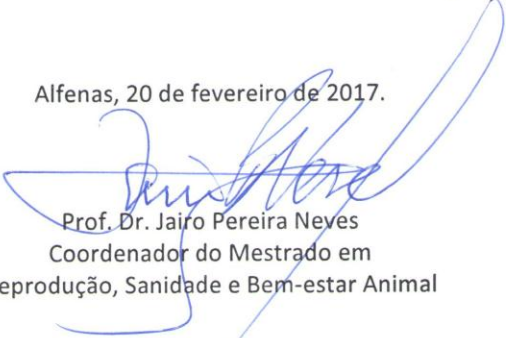

Prof. Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo

Orientador


Prof. Dr. Miller Pereira Palhão


Prof. Dr. Lincoln da Silva Amorim

Alfenas, 20 de fevereiro de 2017.


Prof. Dr. Jairo Pereira Neves
Coordenador do Mestrado em
Reprodução, Sanidade e Bem-estar Animal

Dedico não só este trabalho, mas toda a minha vida aos meus pais, Maria Inês Freitas Patrocínio e José Bosco Patrocínio, por nunca terem medido esforços para que eu pudesse alcançar meus objetivos. E por sempre acreditarem em meu empenho e dedicação durante a minha preparação profissional.

Eternos agradecimentos!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, Pai sábio, amoroso, nosso melhor orientador, de quem somos alunos eternos e que nos oferece o dom da vida mesmo sem merecermos.

Aos meus amados pais, Maria e José, por todo amor, carinho, educação e apoio que me deram para que eu pudesse realizar um sonho de ser Mestre; tudo o que sou devo a vocês!

Aos meus irmãos, Talita, Guilherme, Singer e Sidnei pelo carinho e compreensão com que dividiram comigo os bons e os difíceis momentos.

Ao meu noivo Reginaldo, que soube ser meu melhor amigo nessa etapa tão importante da minha vida.

Ao meu orientador, Luiz Sérgio de Almeida Camargo, pela oportunidade e todo apoio que me deu durante o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

A todos meus colegas de trabalho, Tatimara, Tochimara, Lincoln, professora Ester, Ângela, Natália, Tina, professor Carlos, Lucas, Ricardo, Eduardo, Josiane, Fabiane, Carolina, Eliza, Luciano, Mariana, Carol, Juliana, Rosângela, Felipe, Aécio, Hugo, Bráulio e Adalberto, que contribuíram não apenas com este trabalho, mas com todo o meu caminhar profissional e pessoal.

Aos meus amados mestres, que com amor e dedicação, compartilharam seus conhecimentos, não apenas como um ensino, mas por terem nos feito aprender.

Aos professores Gilson Costa Macedo, Adilson David da Silva e Nadia Rezende Barbosa Raposo da UFJF, por gentilmente, cederem o resveratrol e o análogo de resveratrol.

Agradecimento especial a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa, Juiz de Fora/MG) e a empresa de Biotecnologia e Treinamento em Reprodução Animal (Biotran), que auxiliaram financeiramente para esta pesquisa.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e de minha vida profissional.

Muito obrigada!

“ Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana. ”

Carl Gustav Jung

RESUMO

PATROCÍNIO, Taís Aparecida. **Desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos cultivados em meio com análogo de resveratrol.** Orientador: Prof. Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo. Alfenas: UNIFENAS, 2017. Curso de pós-graduação em Reprodução Sanidade e Bem-Estar Animal.

Este estudo avaliou o efeito de AR33 (fórmula com patente-pendente), um análogo de resveratrol, no cultivo de embriões fecundados *in vitro*. Complexos *cumulus-oócitos* (COCs) recuperados de ovários bovinos coletados no matadouro, foram maturados *in vitro* durante 24 h e fertilizados *in vitro* por 20 h, ambos em 38.8 °C sob 5% de CO₂ em ar e alta umidade. Prováveis zigotos parcialmente desnudos foram distribuídos aleatoriamente em dois experimentos. Experimento 1: 0 (controle, n=347), 0.1 µM (n=337), 0.5 µM (n=277) e 2.5 µM de AR33 (n=343) com 2,5% de soro fetal bovino (SFB), e experimento 2: 2.5 µM de AR33 (n=381), 0.5 µM de resveratrol (n=381), ambos com 2,5% SFB e 0 (controle, n=341) com 10% SFB. O meio base para todos os tratamentos foi SOFaa e as condições de incubação foram de 38.8 °C sob 5% de CO₂ em ar e alta umidade. Metade do meio de cultura foi renovado (feeding) nos dias 3 e 5 após a fertilização. A taxa de clivagem foi avaliada no dia 3 e a taxa de blastocisto (Bl) nos dias 7 e 8 pós-fecundação. No dia 8, os blastocistos foram fixados e posteriormente submetidos a análise do número de células e índice apoptótico. As taxas de clivagem e de blastocistos foram analisadas por modelos de regressão logística (Proc Logistic), e o número de células e índice apoptótico por modelos lineares mistos (Proc Mixed) usando o pacote estatístico SAS. No experimento 1, a taxa de clivagem (P<0.05) foi maior para 2.5 µM (69.0±4.4%) do que para 0, 0.1 e 0.5 µM de AR33 (62.1±2.0%, 60.7±5.9% e 56.7±5.8%, respectivamente). No dia 7, a taxa de Bl foi semelhante (P>0.05) entre 0.1, 0.5 e 2.5 µM (18.1±5.4%, 17.5±2.9% e 19.4±3.3%, respectivamente) e todos eles foram superiores (P<0,05) à 0 µM AR33 (12.4±2.5%). No dia 8, apenas 0.1 e 2.5 µM (21.0±5.0% e 24.6±3.3%) foram maiores do que 0 µM AR33 (15.2±2.5%). Não houve diferença (P>0,05) entre tratamentos quanto ao número de células totais (CT) e da massa celular interna (MCI); contudo, o índice apoptótico nas CT e na MCI foram maiores para 0 e 2.5 µM (11.36 e 9.89%; 20.52 e 15.85%) do que em 0.1 e 0.5 µM AR33 (4.66 e 4.82%; 8.47 e 10.92%). No experimento 2 a taxa de clivagem (P<0,05) foi maior no controle (80.8±3.4%) do que no tratamento com 0.5 µM resveratrol (76.4±3.6%), e este último semelhante à 2.5 µM AR33 (76.9±1.2%). Não houve diferenças (P>0,05) para a taxa de Bl nos dias 7 e 8. O índice apoptótico nas CT e MCI foi maior no controle (8.9 e 14.9%, respectivamente) do que para 2.5 µM AR33 e 0.5 µM resveratrol (6.4 e 5.5%; 11.1 e 8.8%, respectivamente). Em conclusão, o resveratrol e o seu análogo sintético testado neste estudo melhoram o desenvolvimento embrionário bovino em meio de cultura suplementado com 2,5% SFB sob 5% de CO₂ em ar.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; Antioxidante; Cultivo *in vitro*; Soro fetal bovino.

ABSTRACT

PATROCÍNIO, Taís Aparecida. ***In vitro* development of bovine embryos cultured in medium with analogue of resveratrol.** Advisor: Prof. Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo. Alfenas: UNIFENAS, 2017. Postgraduate course in Reproduction Health and Animal Welfare.

This study evaluated the effect of AR33 (patent-pending formula), a resveratrol analogue, in the culture of *in vitro* fertilized embryos. *Cumulus-oocyte* complexes (COCs) recovered from bovine ovaries collected at the slaughterhouse were matured *in vitro* for 24 h and fertilized *in vitro* for 20 h, both at 38.8 °C under 5% CO₂ in air and high humidity. Probably partially nude zygotes were randomly distributed in two experiments. Experiment 1: 0 (control, n = 347), 0.1 µM (n = 337), 0.5 µM (n = 277) and 2.5 µM AR33 (n = 343) with 2.5% fetal bovine serum (FBS) and experiment 2: 2.5 µM AR33 (n = 381), 0.5 µM resveratrol (n = 381), both with 2.5% SFB and 0 (control, n = 341) with 10% FBS. The base medium for all treatments was SOFaa and incubation conditions were 38.8 °C under 5% CO₂ in air and high humidity. Half of the culture medium was fed on days 3 and 5 after fertilization. The cleavage rate was evaluated on day 3 and the blastocyst rate (B1) on days 7 and 8 post-fertilization. At day 8, the blastocysts were fixed and subsequently submitted to analysis of the number of cells and apoptotic index. Cleavage and blastocyst rates were analyzed by logistic regression models (Proc Logistic), and the number of cells and apoptotic index by mixed linear models (Proc Mixed) using the SAS statistical package. In experiment 1, the cleavage rate (P < 0.05) was higher at 2.5 µM (69.0 ± 4.4%) than at 0, 0.1 and 0.5 µM AR33 (62.1 ± 2.0%, 60.7 ± 5.9% and 56.7 ± 5.8%, respectively). At day 7, the B1 rate was similar (P > 0.05) between 0.1, 0.5 and 2.5 µM (18.1 ± 5.4%, 17.5 ± 2.9% and 19.4 ± 3.3%, respectively) and all were higher (P < 0.05) at 0 µM AR33 (12.4 ± 2.5%). At day 8, only 0.1 and 2.5 µM (21.0 ± 5.0% and 24.6 ± 3.3%) were higher than 0 µM AR33 (15.2 ± 2.5%). There was no difference (P > 0.05) between treatments regarding total cell number (TC) and internal cell mass (MCI); However, the apoptotic index in TC and MCI was higher for 0 and 2.5 µM (11.36 and 9.89%, 20.52 and 15.85%) than in 0.1 and 0.5 µM AR33 (4.66 and 4.82%, 8.47 and 10.92%). In the experiment 2 the cleavage rate (P < 0.05) was higher in the control (80.8 ± 3.4%) than in the treatment with 0.5 µM resveratrol (76.4 ± 3.6%), but similar to 2.5 µM AR33 (76.9 ± 1.2%). There were no differences (P > 0.05) for the B1 rate on days 7 and 8. The apoptotic index in the TC and MCI was higher in the control (8.9 and 14.9%, respectively) than in the 2.5 µM AR33 and 0.5 µM resveratrol (6.4 and 5.5%, 11.1 and 8.8%, respectively). In conclusion, resveratrol and its synthetic analogue tested in this study improve bovine embryonic development in culture medium supplemented with 2.5% FBS under 5% CO₂ in air.

Keyword: Oxidative stress; Antioxidant; *In vitro* culture; Fetal bovine serum.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Reações químicas que resultam na formação das espécies reativas de oxigênio	15
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito de diferentes doses de análogo de resveratrol número 33 (AR33) no desenvolvimento de embriões em meio SOFaa com 2.5% de soro fetal bovino	29
Tabela 2 – Número de células e apoptose em embriões produzidos <i>in vitro</i> com diferentes doses de análogo de resveratrol numero 33 (AR33) em meio SOFaa com 2.5% de soro fetal bovino	30
Tabela 3 – Efeito de resveratrol e de seu análogo (AR33) no desenvolvimento embrionário em meio SOFaa com 2.5% de SFB. Valores mostrados como média±EPM	31
Tabela 4 – Número de células e apoptose em embriões produzidos <i>in vitro</i> com resveratrol ou seu análogo em meio SOFaa com SFB 2.5%	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGPI – Ácidos graxos poliinsaturados

AR33 – Análogo de resveratrol

ATP – Adenosina trifosfato

Bl – Blastocisto

cAMP – Adenosina Monofosfato Cíclico

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CIV – Cultivo *in vitro*

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

COCs – Complexo *cumulus*-oócito

CT – Células totais

DMSO – Dimetil sulfoxido

DNA – Ácido desorribonucleico

Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

FIV – Fertilização *in vitro*

GSH – Glutathione

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

MCI – Massa Celular Interna

MG – Minas Gerais

MIV – Maturação *in vitro*

NAC – N-acetil-L-cisteína

NAD – Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina

$\text{OH}^\cdot$ – Radical hidroxila

$\text{O}^\cdot$ – Radical superóxido

PIVE – Produção *in vitro* de embriões

RNA – Ácido ribonucleico

SFB – Soro Fetal Bovino

SOD_2 – Superóxido Dismutase

SOF – Fluido sintético do oviduto

SOFaa – Fluido sintético do oviduto enriquecido com aminoácidos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Agentes causadores do estresse oxidativo	14
2.2 Sistemas celulares antioxidativos	16
2.3 Consequências do estresse oxidativo no oócito e subsequente embrião	16
2.4 Medidas para amenizar o efeito oxidativo no cultivo <i>in vitro</i>	17
2.4.1 Uso de agentes antioxidantes	17
3 CAPÍTULO 1 – DESENVOLVIMENTO <i>in vitro</i> DE EMBRIÕES BOVINOS CULTIVADOS EM MEIO COM ANÁLOGO DE RESVERATROL	22
1. Introdução	25
2. Materiais e Métodos	26
2.1. Delineamento experimental	26
2.2. Preparo do resveratrol e do AR33	27
2.3. Produção <i>in vitro</i> de embriões	27
2.4. Avaliação do número de células e índice de apoptose	28
2.5. Análise estatística	28
3. Resultados	28
3.1. Experimento 1: Diferentes doses de AR33 no CIV com 2.5% de SFB	29
3.1.1. Taxa de embriões	29
3.1.2. Índice apoptótico	29
3.2. Experimento 2: Resveratrol e seu análogo no CIV com 2.5% de SFB	30
3.2.1. Taxa de embriões	30
3.2.2. Índice apoptótico	31
4. Discussão	32
4.1 Conclusões	33
Referências	35
4 REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Um dos efeitos do cultivo *in vitro* (CIV) é o estresse oxidativo causado pelo ambiente sub-ótimo, reduzindo a viabilidade de oócitos e embriões. Espécies reativas de oxigênio (EROs), ou radicais livres, são formados a partir do metabolismo embrionário ou do ambiente *in vitro* que circunda o embrião (GUERIN et al., 2001) e estão associados ao atraso no desenvolvimento embrionário e indução de apoptose (BETTS & MADAN, 2008).

Diversas substâncias antioxidantes têm sido testadas, geralmente com resultados positivos. Recentes estudos mostraram um efeito positivo do resveratrol na maturação de oócitos bovinos (WANG et al., 2014). Resveratrol é um antioxidante polifenólico encontrado em plantas. Atua na remoção de radicais superóxidos, redução da produção de EROs em mitocôndrias, inibição de peroxidação lipídica e na regulação da expressão de co-fatores e enzimas antioxidantes (PERVAIZ & HOLME, 2009). Além disso, o resveratrol regula a expressão de Sirtuins, uma deacetilase dependente de NAD que regula o metabolismo e o envelhecimento (GIBLIN et al., 2014). Foi demonstrado que baixos níveis de resveratrol durante o CIV aumentam a resistência dos embriões produzidos *in vitro* (PIV) submetidos ao congelamento, favorecendo a qualidade embrionária (SALZANO et al., 2014). Assim, o resveratrol é um exemplo de um potente antioxidante e modificações em sua estrutura pode melhorar sua atividade biológica. Análogos de resveratrol tem sido testado em diferentes tipos de células com o objetivo de alcançar maior atividade protetora com menor redução da viabilidade celular. Um análogo de resveratrol testado em células CHO mostrou alta capacidade de reduzir radicais livres (JEONG et al., 2014). Na UFJF em Juiz de Fora, verificou-se que vários análogos testados apresentavam baixa toxicidade e alta atividade antitumoral (DIB et al., 2016) e alguns ainda apresentavam atividade anti-inflamatória (FRANCO et al., 2016).

Este trabalho teve como principal objetivo avaliar o efeito de doses de um análogo de resveratrol (AR33) no desenvolvimento de embriões cultivados *in vitro*, comparando a dose mais eficiente com o resveratrol.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Os embriões de mamíferos produzidos *in vitro*, comparados com os embriões desenvolvidos *in vivo*, são conhecidos por terem competência reduzida (WANG et al., 1999). Um dos efeitos do CIV é o estresse oxidativo causado pelo ambiente sub-ótimo (TAKAHASHI et al., 2012; AGARWAL et al., 2014). Oócitos e embriões são sensíveis ao estresse oxidativo causado pelo ambiente *in vitro* (LUVONI et al., 1996; MARTÍN-ROMERO et al., 2008) e os seus mecanismos de defesa são insuficientes para proteger as delicadas estruturas celulares.

Deficiências em condições de cultura *in vitro* podem levar ao desenvolvimento anormal do embrião, devido a baixa frequência da formação de blastocistos geralmente com índice de células reduzidos, podendo afetar a vida fetal e pós-natal (DURANTHON et al., 2008). Portanto, a otimização do sistema de cultura *in vitro* é uma medida crítica para melhorar a viabilidade do embrião (SALZANO et al. 2014).

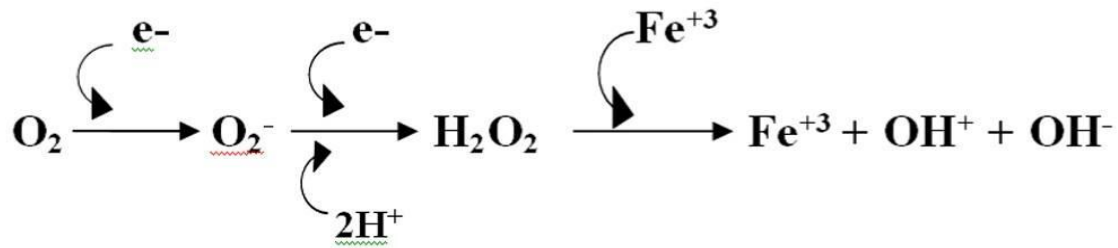
2.1 Agentes causadores do estresse oxidativo

A produção contínua e excessiva de EROs associada à depleção da concentração intracelular de glutathiona (GSH) são as principais causas da baixa eficiência da PIV em diversas espécies (AGARWAL et al., 2005; LUBERDA, 2005). Isto se deve às condições de CIV e à ausência do sistema de defesa antioxidante materno (CROCOMO et al., 2012). Além disso, o estresse oxidativo, está envolvido no envelhecimento celular e na patogênese de muitas doenças como o câncer, ataque cardíaco, derrame, diabetes, doenças hepáticas e entre outras (WU et al., 2004).

As mitocôndrias têm uma função complexa no estado redox celular. Nos estágios iniciais de desenvolvimento pré-implantação do embrião, estas organelas celulares são a principal fonte de energia através da produção de adenosina trifosfato (ATP) pela fosforilação oxidativa (DUMOLLARD et al., 2007). Como tal, a atividade mitocondrial está associada à competência do oócito e desenvolvimento do blastocisto (WILDING et al., 2001; CHAPPEL, 2013). No entanto, além da produção do ATP, a fosforilação oxidativa também resulta na produção de EROs, agentes responsáveis pelo estresse oxidativo (SILVA et al., 2015).

A formação de EROs durante a respiração celular, consiste na molécula de oxigênio (O_2) que deve receber quatro elétrons e ser completamente reduzida a duas moléculas de água (H_2O). Se o O_2 for parcialmente reduzido por somente 1 elétron, o produto desta redução será o radical superóxido (O_2^-). Este radical, ao receber mais um elétron e 2 íons de hidrogênio, formará o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Da reação entre o H_2O_2 e íons de ferro ou cobre ocorrerá a formação do radical hidroxila ($OH^\cdot$), considerado o mais reativo (Figura 1). Este último também poder ser formado pela reação entre o peróxido de hidrogênio e superóxido (FERREIRA, 1997; GATE et al., 1999).

Figura 1. Reações químicas que resultam na formação das espécies reativas de oxigênio.



Modificado de Ferreira & Matsubara, 1997.

Os radicais O_2^- e $OH^\cdot$ são considerados radicais livres, pois possuem elétrons desemparelhados em sua órbita mais externa. O H_2O_2 , apesar de não ser um radical livre, representa um metabólito parcialmente reduzido (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004). Logo, todos estes metabólitos derivados da molécula de O_2 são denominados de EROs em função da elevada instabilidade e reatividade (NORDBERG & ARNÉR, 2001).

Para se tornarem estáveis, as EROs precisam adquirir elétrons. Sendo assim, reagem com quaisquer moléculas ao seu redor (lipídios, carboidratos, ácidos nucleicos) provocando a oxidação. Como consequência, reações em cadeia são desencadeadas resultando em danos celulares como a peroxidação lipídica, alterações mitocondriais, desnaturação proteica, bloqueio no desenvolvimento embrionário, redução da motilidade espermática, alteração do fuso meiótico, depleção de ATP e apoptose celular (AGARWAL et al., 2005; GUÉRIN et al., 2001).

2.2 Sistemas celulares antioxidativos

As EROs são geradas como consequência direta do metabolismo de O₂ (GUÉRIN et al., 2001). Como proteção aos efeitos nocivos do excesso de metabólitos de oxigênio, o organismo dispõe de dois sistemas antioxidantes: não enzimáticos e enzimáticos. Estes atuam, inibindo a formação e ação oxidativa das EROs, e reparando as lesões provocadas pelos metabólitos oxidativos (SIES, 1993).

O sistema antioxidante não enzimático inclui: compostos de baixo peso molecular dieta ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), selênio, zinco, taurinas, hipotaurinas, caroteno, ácido lipóico, que estão presentes na dieta (GUÉRIN et al., 2001). E adicionalmente os compostos tióis como: cistina, cisteína, cisteamina e beta-mercaptoetanol, utilizados nos meios de cultivo oocitário e embrionário *in vitro* (DE MATOS et al., 2002).

2.3 Consequências do estresse oxidativo no oócito e subsequente embrião

As EROs, ou radicais livres, são naturalmente geradas durante o metabolismo aeróbico (GUÉRIN et al., 2001). Deste modo, estão presentes em todos os tipos celulares. Em situação de equilíbrio, exercem efeitos benéficos atuando como moléculas sinalizadoras em processos fisiológicos como na regeneração tecidual, sinalização hormonal, esteroidogênese, regulação redox intracelular e embriogênese (AGARWAL et al., 2008).

No entanto, quando a concentração de EROs é ultrapassada do limite fisiológico, ocorrem efeitos prejudiciais às células, resultando em alteração e/ou morte celular (AGARWAL et al., 2005). Além do metabolismo intracelular, o estresse oxidativo também pode ser favorecido pelas condições ambientais às quais oócitos e embriões são submetidos durante a PIV. Tais condições envolvem a concentração de oxigênio, presença de espermatozoides, componentes do meio e exposição à luz ou ao calor (GUÉRIN et al., 2001).

Os efeitos prejudiciais do oxigênio derivado dos radicais livres durante a CIV têm demonstrados em várias espécies (SALZANO et al., 2014; SILVA et al., 2015). Tem sido relatado que as EROs induzem disfunção nas mitocôndrias, ácido desorribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA) (COMPORT, 1989), bem como a inibição da fusão espermatozoide-oócito (AITKEN et al., 1993).

Dentre os efeitos deletérios do estresse oxidativo está a peroxidação lipídica, relacionada ao bloqueio do desenvolvimento e redução da viabilidade oocitária e embrionária (CROCOMO et al., 2012). A lipoperoxidação consiste em uma reação em cadeia desencadeada pela ação das EROs sobre os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), resultando em alterações celulares irreversíveis (LIMA & ABDALLA, 2001). Devido a isto, é considerada um dos mais importantes efeitos citotóxicos decorrentes do estresse oxidativo (McBRIDE & KRAEMER, 1999).

Devido à grande quantidade de AGPI, as membranas celulares são mais susceptíveis à deteriorização lipídica. As alterações decorrentes deste processo incluem: destruição da estrutura e alteração da sua permeabilidade. Consequentemente, há perda da seletividade para entrada e saída de nutrientes e substâncias tóxicas, liberação do conteúdo das organelas, formação de produtos citotóxicos e alteração do DNA, culminando com a morte celular (MELLLO et al., 1983; HERSHKO, 1989).

Nas biotecnologias de reprodução, a lipoperoxidação decorrente do estresse oxidativo é considerada uma das principais causas de baixa fertilidade dos espermatozoides submetidos aos processos de criopreservação e da baixa eficiência dos sistemas de cultivo oocitário e embrionário *in vitro* (NASR-ESFAHANI et al., 1990).

2.4 Medidas para amenizar o efeito oxidativo no cultivo *in vitro*

Para proteger os oócitos e embriões do estresse oxidativo, vários antioxidantes podem ser adicionados aos meios de cultura (ALI et al., 2003), afim de melhorar o desenvolvimento embrionário através do regulamento dos níveis de EROs (OLSON & SEIDEL, 2000; HOSSEINI et al., 2009; YUAN et al., 2012).

2.4.1 Uso de agentes antioxidantes

Para modular meios de cultura com EROs extracelulares, pode-se utilizar suplementos com antioxidantes enzimáticos extracelulares, tais como SOD ou a catalase. A SOD é uma enzima que inicialmente induz à conversação do O_2 por H_2O_2 , que é removida pela catalase e *Glutathione* peroxidase (MEISTER, 1983). Há relatos conflitantes na literatura sobre o

efeito destas enzimas que neutralizam EROS na PIV. Meios de CIV suplementados com SOD exerceram um efeito de proteção ao estresse oxidativo no desenvolvimento de embriões de camundongos fertilizados *in vitro* e *in vivo* (NONOGAKI et al., 1991; NONOGAKI et al., 1992). Também tem sido mostrado que a suplementação do meio de cultura livre de proteínas com SOD aumentou a proporção de zigotos de coelho em desenvolvimento para a fase de blastocisto expandido (LIM et al., 1996). No entanto, outros autores relataram que a taxa de oócitos, mórula e blastocisto de bovinos não melhoraram quando a MIV foi suplementada com SOD (LIU & FOOTE, 1995; LUVONI et al., 1996). No estudo de Ali et al., 2003, nenhum efeito benéfico de antioxidantes extracelulares foi observado, provavelmente porque as células do *cumulus* desempenham um papel protetor que isola o oócito do meio extracelular.

É também possível adicionar antioxidantes metabolizáveis para o meio de cultura, em vez de antioxidantes enzimáticos. A GSH é um antioxidante natural presente em ambos os gametas, mas o seu nível varia. A concentração de GSH intracelular aumenta com o progresso dos oócitos, da vesícula germinal a fase de metáfase II. Porém, GSH é inferior em óvulos fertilizados na fase de pró-núcleo, quando comparados com os oócitos maduros (CALVIN et al., 1986; FUNAHASHI et al., 1995). Assim, os níveis de GSH encontrados em oócitos no final de maturação, são considerados como um bom marcador bioquímico para a viabilidade do oócito (ABEYDEERA et al., 1998).

Tem sido relatado efeitos positivos da cisteína nos meios de maturação *in vitro* (MIV) e CIV em embriões de bovinos e suínos; no entanto, ainda há conflitos com relação aos resultados obtidos (ALI et al., 2003; KATAYAMA et al., 2007). Apesar do antioxidante ser diretamente aproveitada pelo oócito e embrião para síntese de GSH, sua estabilidade no meio extracelular é muito baixa, sendo oxidada em cistina em uma hora de cultivo (KOBAYASHI et al., 2007).

Devido a sua instabilidade biológica, alguns autores associaram a cisteína e/ou cistina com β -mercaptoetanol e/ou cisteamina aos meios de CIV e MIV, o que resultou em maiores taxas de blastocistos e redução da apoptose, em diferentes espécies animais (TAKAHASHI et al., 2002; GASPARRINI et al., 2006; KOBAYASHI et al., 2006).

Enquanto na MIV e CIV, a adição de antioxidantes promovem efeitos benéficos, supõe-se que o meio de fertilização *in vitro* (FIV) não deve conter antioxidante, pois as EROs são fundamentais para hiperativação, capacitação e reação acrossômica dos espermatozoides

(STRADAIOLI et al., 2007), e na fusão entre oócito e espermatozoide (BLODIN et al., 1997). Segundo Ali et al., 2003, a presença de maiores concentrações de cisteína, NAC ou catalase, durante o período FIV reduz significativamente a taxa de clivagem e subsequente desenvolvimento embrionário.

O resveratrol (3, 4', 5-trihidroxiestilbeno) é uma fitoalexina identificada em mais de 70 espécies de plantas, incluindo as uvas, ameixas e amendoim (BAUR & SINCLAIR, 2006). Ele também é um potente antioxidante polifenólico natural, que contribui para os efeitos benéficos do vinho tinto sobre a prevenção das doenças cardiovasculares humana. Recentemente, o interesse pelo resveratrol aumentou exponencialmente, concluindo que esta molécula tem efeito positivo sobre a quimioprevenção do câncer, processos inflamatórios, e auxilia nos vários aspectos do metabolismo, levando a melhoria do tempo de vida de vários organismos, desde as leveduras aos vertebrados (PIROLA & FRÖJDÖ, 2008). No entanto, os mecanismos subjacentes e as funções biológicas deste agente antioxidante não são completamente compreendidos.

Vários estudos têm sido realizados (KWAK et al., 2012; HUANG et al., 2013) e efeito positivo do resveratrol sobre o desenvolvimento embrionário *in vitro* foi demonstrada em suínos, indicado pela formação de mais blastocistos e de melhor qualidade (LEE et al., 2010). Recentemente, Wang et al. (2014) demonstraram que a suplementação com 1 μ M de resveratrol na MIV, aumenta a secreção de progesterona e diminui a de estradiol pelas células do *cumulus*, melhora a expansão do *cumulus* e promove a formação de corpúsculos polares em oócitos de bovinos, favorecendo o aumento de blastocistos. Um outro estudo relatou que baixos níveis de resveratrol como 0.5 μ M durante o CIV, melhora a qualidade dos embriões de PIV, indicado pela sua maior resistência à congelação (SALZANO et al., 2014).

O resveratrol é um ativador específico de Sirtuina 1 (SIRT1) (TAKEO et al., 2014). SIRT1 pertence à família sirtuina de classe III de nicotinamida adenina dinucleotido (NAD⁺) - desacetilases de proteínas dependentes, reduzida em oócitos envelhecidos (DI EMIDIO et al., 2014). A ativação desta via de deacetilases é conhecida por ser benéfica para o oócito e desenvolvimento embrionário *in vitro* de camundongos, sugerindo que este mecanismo pode contribuir para o declínio na qualidade do oócito com idade avançada (KAWAMURA et al., 2010; ZHANG et al., 2014). Além disso, trabalhos recentes mostram que a via SIRT1 está localizado na montante de FOX O3a-MnSOD eixo e é regulada positivamente na presença de estresse oxidativo em oócitos (DI EMIDIO et al., 2014).

Alguns estudos tem indicado que o resveratrol melhora a função mitocondrial ativando SIRT1 (WANG et al., 2014). Autores observaram que o resveratrol provocou um aumento de quatorze vezes na superóxido dismutase 2 (SOD2) (ROBB et al., 2008). Esta por sua vez, reduz superóxido e, assim, confere resistência à disfunção mitocondrial, alterações da permeabilidade, e apoptose celular em várias doenças (MACMILLAN-CROW & CRUTHIRDS, 2001). Além disso, tem sido demonstrado que o antioxidante aumenta os níveis intracelulares de GSH em células epiteliais do pulmão, protegendo contra o estresse oxidativo induzido pelo cigarro (KODE et al., 2008). Outro estudo relatou que o agente antioxidante, aumentou a taxa de sobrevivência dos oócitos bovinos após a maturação, indicado pela melhoria da qualidade do oocitária (WANG et al., 2014).

A concentração de 10 μ M de resveratrol na MIV, ocasionou efeitos pró-apoptóticos exercida sobre células somáticas (KIM et al., 2004). Nas concentrações de 20 e 40 μ M durante a MIV de bovino reduziu significativamente a percentagem de oócitos que atingiram a fase completa de maturação (POCAR et al., 2004). Portanto, parece que substancialmente, concentrações elevadas de resveratrol pode ter um efeito negativo na maturação de oócitos bovinos. Este efeito negativo pode ser causado pela inibição competitiva das atividades de várias fosfodiesterases, resultando em um aumento na concentração de cAMP citosólico e, finalmente, o retardamento maturação do oócito (PARK et al., 2012).

Muitos estudos têm sido realizados para identificar o produto biológico e atividades desempenhadas pelo resveratrol em mamíferos de reprodução (COMIZZOLI et al., 2009; KWAK et al., 2012). No entanto, há poucos dados disponíveis sobre os efeitos do antioxidante, e principalmente, os mecanismos moleculares pelo qual o resveratrol exerce os seus efeitos, que permanecem indefinidos (WANG et al., 2014).

Baseados em seus diversos efeitos celulares, o resveratrol parece ser uma agente antioxidativo mais abrangente que os demais já testados em diferentes tipos de células e pode ser uma alternativa mais adequada para a criopreservação de sêmen de ruminantes. Seus análogos podem ser ainda mais eficientes pois são desenvolvidos para ter maior atividade com menor impacto na viabilidade celular. Um análogo de resveratrol testado em células CHO mostrou alta capacidade de reduzir radicais livres (JEONG et al., 2014). Verificou-se que vários análogos testados em cultivo celular apresentavam baixa toxicidade e alta atividade antitumoral (DIB et al., 2016) e alguns ainda apresentavam atividade anti-inflamatória (FRANCO et al., 2016). Contudo,

não há estudos sobre uso de análogos de resveratrol no cultivo embrionário *in vitro* e se sua eficiência pode ser similar ou superior ao resveratrol.

3 CAPÍTULO 1 – EFEITO DO ANÁLOGO DE RESVERATROL NO DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS FERTILIZADOS *IN VITRO*

O presente artigo encontra-se de acordo com as normas da submissão exigidas pelo periódico *Theriogenology*. qualis A2. A ser submetido.

Efeito do análogo de resveratrol no desenvolvimento de embriões bovinos fertilizados *in vitro*

Taís Aparecida Patrocínio^a, taispatrocinio@hotmail.com

Ph.D. Carlos Antônio de Carvalho Fernandes^b, carlos@biotran.com.br

Ph.D. Lincoln da Silva Amorim^b, linsamorimufv@gmail.com

Ms. Josiane Rossi Ribeiro^b, josiane@biotran.com.br

Dr. Gilson Costa Macedo^c, gilson.macedo@ufjf.edu.br

Dr. Adilson David da Silva^c, david.silva@ufjf.edu.br

Dr Nadia Rezende Raposo Barbosa^c, nadiacritt@gmail.com

Dr. Luiz Sergio de Almeida Camargo^{*d}, luiz.camargo@embrapa.br

^aMestrado em Reprodução Animal. UNIFENAS. Rodovia MG 179 – Km 0. C.P. 37130-000. Minas Gerais. Brasil. Número do telefone: (+5535) 32993000.

^bReprodução Animal. BIOTRAN. Rua Tatuim 447. C.P. 37130-000. MG. Brasil. Número do telefone: (+5535) 32914762.

^cUniversidade Federal de Juiz de Fora. UFJF. Rua José Lourenço Kelmer. C.P. 36036-900. MG. Brasil.

^dEmpresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Gado de Leite. C.P. 36038-330. MG. Brasil. Número do telefone: (+5535) 3311-7400.

* Autor correspondente

Resumo

Este estudo avaliou o efeito do resveratrol e um análogo de resveratrol (AR33) no cultivo de embriões fecundados *in vitro*. Complexos *cumulus*-oócitos (COCs) foram maturados e fertilizados *in vitro* e prováveis zigotos foram distribuídos aleatoriamente em dois experimentos. O experimento 1 avaliou diferentes doses de AR33 (0, 0,1, 0,5 e 2,5 μM) em meio com 2,5% de soro fetal bovino (SFB). O experimento 2 avaliou o efeito do resveratrol (0,5 μM) e do AR33 (2,5 μM) em meio com 2,5 SFB, comparando-os com sistema de cultivo embrionário sem resveratrol ou AR33 (controle) contendo 10% de SFB. O meio base em ambos experimentos foi SOFaa e as condições de incubação foram de 38,8 °C sob 5% de CO_2 em ar e alta umidade. Metade do meio de cultura foi renovado nos dias 3 e 5 após a fertilização. A taxa de clivagem foi avaliada no dia 3 e a taxa de blastocisto (Bl) nos dias 7 e 8. Blastocistos no dia 8 foram fixados para a análise do número de células e índice apoptótico. As taxas de clivagem e de blastocistos foram analisadas por modelos de regressão logística (Proc Logistic) e o número de células e índice apoptótico por modelos lineares mistos. No experimento 1 observou-se maior taxa de clivagem ($P < 0,05$) com 2,5 μM AR33 ($69,0 \pm 4,4\%$) do que com 0, 0,1 e 0,5 μM AR33 ($62,1 \pm 2,0\%$, $60,7 \pm 5,9\%$ e $56,7 \pm 5,8\%$, respectivamente). A taxa de Bl no dia 7 foi semelhante ($P > 0,05$) entre 0,1, 0,5 e 2,5 μM ($18,1 \pm 5,4\%$, $17,5 \pm 2,9\%$ e $19,4 \pm 3,3\%$, respectivamente) que foram superiores ao tratamento com 0 μM AR33 ($12,4 \pm 2,5\%$). No dia 8 foi observado maior ($P < 0,05$) taxa de blastocistos em 0,1 e 2,5 μM ($21,0 \pm 5,0\%$ e $24,6 \pm 3,3\%$) do que em 0 μM AR33 ($15,2 \pm 2,5\%$). Não houve diferença no número de células totais (CT) e da massa celular interna (MCI) entre os tratamentos. O índice apoptótico nas CT e na MCI foram superiores com 0 e 2,5 μM (11,36 e 9,89%; 20,52 e 15,85%) do que em 0,1 e 0,5 μM AR33 (4,66 e 4,82%; 8,47 e 10,92%). No experimento 2, a clivagem ($P < 0,05$) foi maior no controle sem resveratrol e AR33 ($80,8 \pm 3,4\%$) e com 2,5 μM AR33 ($76,9 \pm 1,2\%$) do que com 0,5 μM resveratrol ($76,4 \pm 3,6\%$). Não houve diferenças ($P > 0,05$) nas taxas de Bl nos dias 7 e 8. O índice apoptótico nas CT e MCI foi maior no controle (8,9 e 14,9%) do que nos tratamentos 2,5 μM AR33 (6,4 e 11,1%) e 0,5 μM resveratrol (5,5 e 8,8%, respectivamente). Em conclusão, o AR33 melhora o desenvolvimento embrionário em condições de cultivo com baixa concentração de soro. Resveratrol e AR33 melhoram a qualidade embrionária quando comparado com meio de cultivo contendo 10% de soror sob 5% de CO_2 em ar.

Palavras-chave: estresse oxidativo, antioxidante, cultivo *in vitro*; soro fetal bovino.

1. Introdução

Um dos efeitos do cultivo *in vitro* (CIV) é o estresse oxidativo causado pelo ambiente sub-ótimo, reduzindo a viabilidade de oócitos e embriões. Espécies reativas de oxigênio (EROs), ou radicais livres, são formados a partir do metabolismo embrionário ou do ambiente *in vitro* que circunda o embrião [1] e estão associados ao atraso no desenvolvimento embrionário e indução de apoptose [2].

Diversas substâncias antioxidantes têm sido testadas para se mitigar os efeitos do estresse oxidativo. Entre essas substâncias vem tendo destaque o resveratrol (3, 4', 5-trihidroxiestilbeno), um antioxidante polifenólico encontrado em diferentes espécies de plantas. Este agente atua na remoção de radicais superóxidos, redução da produção de EROs em mitocôndrias, inibição de peroxidação lipídica e na regulação da expressão de co- fatores e enzimas antioxidantes [3]. Recentemente, o interesse pelo resveratrol aumentou exponencialmente, concluindo que esta molécula tem efeito positivo sobre a quimioprevenção do câncer, processos inflamatórios, e auxilia nos vários aspectos do metabolismo, levando a melhoria do tempo de vida de vários organismos, desde as leveduras aos vertebrados [4]. No entanto, os mecanismos subjacentes e as funções biológicas deste agente antioxidante não são completamente compreendidos.

Estudos têm demonstrado um efeito positivo do resveratrol sobre o desenvolvimento embrionário *in vitro* em suínos, indicado pela formação de mais blastocistos e de melhor qualidade [5]. Wang et al. [6] demonstraram que a suplementação com 1 μ M de resveratrol na MIV, aumenta a secreção de progesterona e diminui a de estradiol pelas células do *cumulus*, melhora a expansão do *cumulus* e promove a formação de corpúsculos polares em oócitos de bovinos, favorecendo o aumento de blastocistos. Porém, outro estudo demonstrou que uma concentração maior de resveratrol de 10 μ M na MIV, ocasionou efeitos pró-apoptóticos exercida sobre células somáticas [7]. E nas concentrações de 20 e 40 μ M durante a MIV de bovino, reduziu significativamente a percentagem de oócitos que atingiram a fase completa de maturação [8].

O resveratrol parece ser um agente antioxidativo mais abrangente que os demais já testados em diferentes tipos de células e pode ser uma alternativa mais adequada para o cultivo embrionário *in vitro*. Seus análogos podem ser ainda mais eficientes pois são desenvolvidos para ter maior atividade com menor impacto na viabilidade celular. Um análogo de resveratrol testado em células CHO mostrou alta capacidade de reduzir radicais livres [9]. Verificou-se que vários análogos testados em cultivo celular apresentavam baixa toxicidade e alta atividade antitumoral [10] e alguns ainda apresentavam atividade anti-inflamatória [11]. Contudo, até o presente não foi encontrado estudos sobre uso de análogos de resveratrol no cultivo embrionário *in vitro* e se sua eficiência pode ser similar ou superior ao resveratrol. Portanto, este trabalho teve como objetivo, avaliar um análogo de resveratrol (AR33) e o resveratrol no cultivo *in vitro* de embriões bovino.

2. Materiais e Métodos

Todos os produtos químicos foram obtidos a partir de Sigma Chemical Company. O resveratrol foi gentilmente cedido pela Dra Nadia Rezende Raposo Barbosa, e o análogo de resveratrol 33 (AR33) cedido pelos Drs Gilson Costa Macedo e Adilson David da Silva da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG.

2.1. Delineamento experimental

Foram conduzidos dois experimentos para avaliar e comparar o efeito da adição do antioxidante resveratrol, e do seu análogo AR33, no CIV de embriões bovinos. Presumíveis zigotos fecundados *in vitro* foram distribuídos aleatoriamente nos tratamentos. O experimento 1 (n= 1314) avaliou diferentes doses de AR33 (0, 0,1, 0,5 e 2,5 μ M) em meio com 2,5% de soro fetal bovino (SFB) em seis repetições. O experimento 2 (N=1103) avaliou o efeito do resveratrol (0.5 μ M) e do AR33 (2.5 μ M) em meio com 2,5% SFB, comparando-os com sistema de cultivo embrionário sem resveratrol ou AR33 (controle) contendo 10% de SFB em três repetições. O meio base em ambos experimentos foi SOFaa e as condições de incubação foram de 38.8 °C sob 5% de CO₂ em ar e alta umidade. Foi avaliado as taxas de clivagem, produção de blastocistos no dia 7 e 8 após a fecundação *in vitro* e o número de células e índice apoptótico em blastocistos coletados no dia 8 pós-fecundação.

2.2. Preparo do resveratrol e do AR33

Resveratrol e AR33, foram dissolvidos separadamente em dimetil sulfóxido (DMSO) para obter um estoque de 2.5 mM (1mg/1.75 mL DMSO) de ambos, que foram mantidos congelados até o dia de utilização, quando as concentrações inferiores foram obtidas por diluições. Em seguida, as soluções estoque foram diluídas na proporção de 1: 1000 em fluido sintético do oviduto (SOF), para reduzir o mínimo da quantidade de DMSO durante a cultura.

2.3. Produção *in vitro* de embriões (PIV)

Os oócitos derivados de abatedouros foram maturados e fertilizados de acordo com o procedimento padrão. Resumidamente, ovários bovinos foram recuperados do abatedouro local e transportados para o laboratório em solução salina fisiológica de 32 a 37°C. Os COCs foram aspirados de folículos de 2 a 8 mm de diâmetro. Apenas aqueles com citoplasma homogêneo e células do *cumulus* em multicamadas foram selecionados, lavados duas vezes no meio de aspiração e uma vez no meio de maturação *in vitro* (MIV). Grupos de 20 COCs foram maturados em 100 µL de meio MIV, coberto com óleo mineral (Sigma-Aldrich), durante 22 h em 38.8 °C, atmosfera de 5 % de CO₂ e 90 % de umidade. Posteriormente, os COCs foram lavados e transferidos em 90 µL do meio de fertilização coberto com óleo mineral (Sigma-Aldrich). Os dois experimentos foram realizados utilizando sêmen convencional congelado, previamente testado a partir do mesmo touro (Segredo, raça Gir, partida 170409). O sêmen foi descongelado em um banho de água a 35 °C por 30 segundos e selecionado por centrifugação (10 min a 700 × g) em um gradiente de mini-percoll (45 e 90 %). O sedimento foi ressuspensionado em meio de fertilização *in vitro* (FIV) e centrifugado por 5 min a 700 × g. O novo sedimento foi diluído com 2 µL de meio FIV e adicionado nas gotas em concentração final de 1×10^6 espermatozoides / mL. Os gametas foram incubados por um período de 12 a 18 h em 38.8 °C. atmosfera de 5 % de CO₂ e 90 % de umidade. Prováveis zigotos foram desnudados parcialmente por repetidas pipetagens, lavou-se duas vezes no mesmo meio CIV e distribui-se aleatoriamente em grupos de 15 a 20 estruturas para cada tratamento em gotas de 80 µL, onde permaneceram por 8 dias. O meio base utilizado para CIV foi SOFaa suplementado com 2.5% de SFB, e as condições de incubação foram de 38.8 °C sob 5% de CO₂ em ar e alta umidade. Metade do meio de cultura foi

renovado (*feeding*) nos dias 3 e 5 após a fertilização. No terceiro dia pós-fecundação *in vitro* registrou-se taxas de clivagem e nos dias 7 e 8 as taxas de blastocistos.

2.4. Avaliação do número de células e índice de apoptose

Blastocistos no dia oito foram fixados em paraformaldeído, e permeabilizados em solução de 0.1% de Triton X-100. Em seguida foram incubados em gotas de TUNEL recobertas com óleo em atmosfera umidificada, no escuro, por 1 hora. Passada esta etapa os embriões foram corados com DAPI (corante de fluorescência) e então transferidos para lâmina e observados em microscópio de fluorescência. O índice apoptótico foi calculado a partir da relação do número total de células e o número de célula contendo corpos apoptóticos.

2.5. Análise estatística

As taxas de clivagem e de blastocistos foram analisadas por modelos de regressão logística (Proc Logistic), e o número de células e índice apoptótico por modelos lineares mistos (Proc Mixed) usando o pacote estatístico SAS. Resultados são mostrados como média±erro padrão da média. Foi considerado nível de significância de $P < 0.05$.

3. Resultados

3.1. Experimento 1: Efeito de diferentes doses de AR33 no CIV com 2.5% SFB

3.1.1. Taxa de embriões

A taxa de clivagem ($P < 0.05$) foi maior para 2.5 μM ($69.0 \pm 4.4\%$) do que para 0, 0.1 e 0.5 μM de AR33 ($62.1 \pm 2.0\%$, $60.7 \pm 5.9\%$ e $56.7 \pm 5.8\%$, respectivamente). No dia 7 do desenvolvimento, a taxa de blastocisto foi semelhante ($P < 0.05$) entre 0.1, 0.5 e 2.5 μM ($18.1 \pm 5.4\%$, $17.5 \pm 2.9\%$ e $19.4 \pm 3.3\%$, respectivamente) e todos eles foram mais elevados ($P < 0.05$) do que 0 μM AR33 ($12.4 \pm 2.5\%$). No dia seguinte, não houve diferença ($P > 0.05$) entre 0.1, 0.5 e 2.5 μM de AR33 ($21.0 \pm 5.0\%$, $18.4 \pm 2.1\%$ e $24.6 \pm 3.3\%$, respectivamente), mas apenas 0.1 e 2.5 μM ($P < 0.05$)

demonstraram maiores do que a taxa de blastocisto no tratamento controle, 0 μ M de AR33 (15.2 $\pm$ 2.5%) (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito de diferentes doses de análogo de resveratrol número 33 (AR33) no desenvolvimento de embriões em meio SOFaa com 2.5% de soro fetal bovino.

AR33 (μ M)	N	Clivagem (%)	Blastocisto dia 7 (%)	Blastocisto dia 8 (%)
0	347	62.1 $\pm$ 2.0 ^b	12.4 $\pm$ 2.5 ^c	15.2 $\pm$ 2.5 ^b
0.1	337	60.7 $\pm$ 5.9 ^b	18.1 $\pm$ 5.4 ^b	21.0 $\pm$ 5.0 ^a
0.5	277	56.7 $\pm$ 5.8 ^b	17.5 $\pm$ 2.9 ^b	18.4 $\pm$ 2.1 ^{ab}
2.5	343	69.0 $\pm$ 4.4 ^a	19.4 $\pm$ 3.3 ^b	24.6 $\pm$ 3.3 ^a

^{a, b}: Valores com diferentes sobrescritos dentro das colunas diferem (p <0.05).

Valores mostrados como média $\pm$ EPM.

AR33: análogo do resveratrol número 33.

3.1.2. Índice apoptótico

Os resultados de número de células e apoptose estão mostrados na Tabela 2. O número de células totais (CT) e da massa celular interna (MCI) foi semelhante (P>0,05) entre os tratamentos. O número de células apoptóticas e o índice apoptótico nas CT, foi maior (P<0,01) em 0 e 2.5 μ M do que para 0.1 e 0.5 μ M de AR33. O número de células apoptóticas na MCI (P>0,05) não foi diferente entre as concentrações de 0 e 2.5 μ M, mas foram maiores (P<0,05) do que em 0.1 e 0.5 μ M de AR33. O maior (P<0,05) índice apoptótico na MCI foi observado com 0 μ M AR33 seguido do tratamento com 2.5 μ M. Os menores valores (P<0,05) foram encontrados com 0,1 e 0,5 μ M de AR33. Maior proporção (P<0,05) de MCI sobre o total de células foi encontrado com 0,1 e 2,5 μ M de AR33 (Tabela 2).

Tabela 2. Número de células e apoptose em embriões produzidos in vitro com diferentes doses de análogo de resveratrol número 33 (AR33) em meio SOFaa com 2.5% de soro fetal bovino.

AR33 (μ M)	N	Cel Total	Cel Apop Total	Índice Apop CT (%)	MCI	Cel Apop MCI	Índice Apop MCI (%)	MCI/Cel Total
-----------------	---	-----------	----------------	--------------------	-----	--------------	---------------------	---------------

0	16	127.06 ^a	14.44 ^a	11.36 ^a	41.81 ^a	8.31 ^a	20.52 ^a	32.78 ^a
0.1	16	124.5 ^a	5.5 ^b	4.66 ^b	46.13 ^a	3.81 ^b	8.47 ^c	38.41 ^b
0.5	17	133.24 ^a	6.12 ^b	4.82 ^b	43.53 ^a	4.41 ^b	10.92 ^c	33 ^a
2.5	21	126.05 ^a	12.33 ^a	9.89 ^a	45.81 ^a	7.29 ^a	15.85 ^b	36.9 ^b

^{a, b, c}: Valores com diferentes sobrescritos dentro das colunas diferem ($p < 0.05$).

AR33: análogo do resveratrol número 33; Cel Total: célula total; Cel Apop: célula apoptótica; Índice Apop: índice apoptótico; CT: células total; MCI: massa celular interna.

3.2. Experimento 2: Efeito do resveratrol e seu análogo AR33 no CIV com 2.5% SFB

3.2.1. Taxa de embriões

Neste experimento foi utilizado a concentração de 2,5 μM AR33 na CIV para comparação com resveratrol, por apresentar maiores taxas de clivagem e de blastocistos e menores índices apoptótico do que o controle (0 μM de resveratrol e de AR33) no experimento 1. A taxa de clivagem ($P < 0,05$) com 0 μM em meio SOF com 10% SFB foi superior ($P < 0,05$) ao tratamento com 0.5 μM resveratrol em 2,5% SFB, mas ambos foram semelhantes ($P > 0,05$) a 2.5 μM AR33 com 2,5% SFB. Não houve diferenças significativas para a proporção de Bl nos dias 7 e 8 do desenvolvimento embrionário (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito de resveratrol e de seu análogo (AR33) no desenvolvimento embrionário em meio SOFaa com 2.5% de SFB. Valores mostrados como média $\pm$ EPM.

Tratamento	N	Clivagem (%)	Blastocisto dia 7 (%)	Blastocisto dia 8 (%)
0 μM + 10% SFB (Controle)	341	80.8 $\pm$ 3.4 ^a	35.5 $\pm$ 10.5	33.0 $\pm$ 9.3
2.5 μM AR33	381	76.9 $\pm$ 1.2 ^{ab}	29.6 $\pm$ 4.4	31.2 $\pm$ 11.7
0.5 μM Resv	381	76.4 $\pm$ 3.6 ^b	32.0 $\pm$ 9.1	29.7 $\pm$ 11.2

^{a, b}: Valores com diferentes sobrescritos dentro das colunas diferem ($p < 0.05$).

Valores mostrados como média $\pm$ EPM.

AR33: análogo do resveratrol número 33.

Resv: resveratrol.

3.2.2. Índice apoptótico

A tabela 4 mostras os resultados do numero de células e apoptose. O tratamento controle (0 μ M de resveratrol e de AR33) obteve embriões com maior número de CT e da MCI do que o tratamento com 0.5 μ M de resveratrol enquanto o tratamento com 2.5 μ M de AR33 obteve valores semelhantes ($P>0,05$) a ambos. O número de células apoptóticas totais e na MCI e o índice apoptótico nas CT e MCI foram maiores ($P<0,05$) no controle do que nos tratamentos com 2.5 μ M AR33 e 0.5 μ M resveratrol. No entanto, os tratamentos com resveratrol e AR33 não apresentaram diferenças entre si ($P>0,05$). Não foi observada diferença na proporção de MCI sobre o total de células entre os tratamentos ($P>0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4. Número de células e apoptose em embriões produzidos *in vitro* com resveratrol ou seu análogo em meio SOFaa com SFB 2.5%.

Tratamento	N	Cel Total	Cel Apop Total	Índice Apop CT (%)	MCI	Cel Apop MCI	Índice Apop MCI(%)	MCI/Cel Total
0 μM + 10% SFB (Controle)	18	110.8 ^a	9.8 ^a	8.9 ^a	40.3 ^a	6 ^a	14.9 ^a	38.1 ^a
2.5 μM AR33	20	103.85 ^{ab}	6.5 ^b	6.4 ^b	39.05 ^{ab}	4.2 ^b	11.1 ^b	38.4 ^a
0.5 μM Resv	16	94.88 ^b	5 ^b	5.5 ^b	35.88 ^b	3.1 ^b	8.8 ^b	36.8 ^a

^{a, b}: Valores com diferentes sobrescritos dentro das colunas diferem (teste de diferença de proporções, $p<0.05$).

AR33: análogo do resveratrol número 33; Resv: resveratrol; Cel Total: célula total; Cel Apop: célula apoptótica; Índice Apop: índice apoptótico; CT: células total; MCI: massa celular interna.

4. Discussão

Um dos problemas enfrentados no cultivo *in vitro* de embriões bovinos é a produção em excesso de radicais livres que levam ao estresse oxidativo e prejudicam o desenvolvimento e a qualidade embrionária. O presente estudo mostrou que a suplementação do meio CIV com o análogo de resveratrol AR33 em meio com concentração reduzida de SFB (2,5%) melhora o desenvolvimento e a qualidade embrionária, evidenciada pelos menores índices apoptóticos do que o controle. Tanto o resveratrol como o seu análogo AR33 com 2,5% SFB também melhoraram a qualidade embrionária quando comparado com meios sem antioxidantes contendo elevada

concentração de SFB (10%), com resultados semelhantes na produção de blastocistos. O segundo experimento mostrou que 0,5 μ M de resveratrol e 2,5 μ M de AR33 são capazes de reduzir os índices apoptóticos nos blastocistos oriundos de fecundação *in vitro*.

A dose ideal de um antioxidante, seja também do análogo é busca para que possa manter o equilíbrio bioquímico. No entanto, o nosso trabalho pode mostrar que baixas concentrações de AR33 não afeta a proporção, mas a qualidade dos embriões. Enquanto que altas concentrações deste agente, pode resultar em efeitos negativos sobre o desenvolvimento embrionário. Isto pode ser confirmado quando elevadas concentrações de resveratrol exercem efeitos anti-proliferação e pró-apoptóticos [12; 13]. Por isso, pode se dizer que os resultados são dependentes das doses. Um efeito dependente da dose foi mostrado em embriões partenogênicos de suínos, com aumento na produção de blastocistos em baixas concentrações e efeitos tóxicos em concentrações elevadas [5]. Apesar que a apoptose é considerada um processo normal em embriões para eliminar as células que se desviem, uma alta incidência de células apoptóticas é associada com a morfologia anormal do embrião [14]. De fato, a percentagem de células apoptóticas são mais elevadas nos blastocistos bovinos produzidos *in vitro* do que os seus homólogos desenvolvidos *in vivo* [15]. Portanto, este estudo sugere que as altas concentrações utilizadas do análogo, que não produziram resultados benéficos podem ser devido à indução de apoptose.

No entanto, é importante ressaltar, que os efeitos positivos ou negativos do uso de antioxidantes dependem da concentração destes no meio extracelular e/ou intracelular, do tempo de cultivo e da espécie [16]. No tratamento que teve elevada proporção de blastocistos havia uma proporção de MCI de 20 a 40%, que é considerado normal para embriões de PIV [17]. Sabe-se que a atribuição da proporção e qualidade das células da MCI de BI, são vitais para a sobrevivência embrionária e fetal [14; 18].

É conhecido que o SFB fornece muitos componentes vitais para o desenvolvimento do embrião como substrato energético, aminoácidos, vitaminas, fatores antioxidantes e quelantes de metais pesados [19]. No entanto, a utilização deste soro, está associado à ocorrência de síndrome do bezerro grande [20], bem como alterações metabólicas e acúmulo excessivo de lipídios [16; 19; 21], anomalias de organelas [16; 22], incluindo a degeneração mitocondrial [22], e a diminuição

da sobrevivência do embrião após a criopreservação [16; 19; 23]. Por isso, se faz necessário reduzir ou até substituir a utilização do soro. Portanto, o nosso trabalho mostrou que é possível produzir embriões bovino *in vitro* com uma concentração baixa de 2.5% de SFB no CIV. Nossos resultados, demonstraram a utilização do análogo de resveratrol nas concentrações de 0.1 e 0.5 μM de AR33 com 2.5 % de SFB que proporcionaram uma boa taxa de embriões e com menor índice apoptótico. Enquanto que a concentração de 2.5 μM também com 2.5 % de SFB, teve a taxa de embriões semelhante com o tratamento que não utilizou antioxidante, mas com uma concentração de 10% de SFB. Outros estudos que adotaram a redução do soro no meio de cultura, também conseguiram resultados satisfatórios. Salzano et al. [24], conseguiu uma alta taxa de embrião altamente resistente a criopreservação, utilizando apenas 5% de SB com 0.5 μM de resveratrol no CIV de embriões bovino. Este efeito benéfico, pode ser explicado pelo fato que embriões *in vitro* produzidos em altas concentrações de soro, acumulam uma alta concentração de lipídeos, fator desfavorável para a criopreservação de embriões [25]. Barceló-Fimbres & Seidel, [21], demonstraram que é possível a PIV de embriões bovinos na ausência de SFB sem afetar drasticamente a produção como a qualidade dos blastocistos.

4.1. Conclusões

Em conclusão, estes resultados demonstraram que a suplementação com resveratrol e seu análogo sintético (AR33), pode melhorar o desenvolvimento embrionário bovino em meio de cultura suplementado com 2.5% SFB sob 5% de CO_2 em ar. Contudo, outros estudos são necessários para alcançar a dose ideal do análogo e compreender o mecanismo subjacente ao seu efeito benéfico.

Agradecimentos

Agradecemos sinceramente à Biotran pelo laboratório, a Embrapa gado de leite por fornecer a microscopia de fluorescência, e ao frigorífico de Poço Fundo, Minas Gerais (MG) pelo material biológico.

Financiamento

Este trabalho foi apoiado Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa, Juiz de Fora/MG) e a empresa de Biotecnologia e Treinamento em Reprodução Animal (Biotran).

Conflito de interesses

Nenhum.

Referências

- [1] Guérin P, El Mouatassim S, Ménéz Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update* 2001;7:175-89.
- [2] Betts DH, Madan P. Permanent embryo arrest: molecular and cellular concepts. *Mol Hum Reprod* 2008;14:445-53. doi: 10.1093/molehr/gan035
- [3] Pervaiz S, Holme AL. Resveratrol: its biologic targets and functional activity. *Antioxid Redox Signal* 2009;11:2851-97.
- [4] Pirola L, Fröjdö S. Resveratrol: one molecule, many targets. *IUBMB Life* 2008;60:323–332.
- [5] Lee J, Padhye A, Sharma A, Song G, Miao J, Mo YY, Wang L, Kemper JK. A pathway involving farnesoid X receptor and small heterodimer partner positively regulates hepatic sirtuin 1 levels via microRNA-34a inhibition. *J Biol Chem* 2010; 285:12604–12611.
- [6] Wang F, Tian X, Zhang L, He C, Ji P, Li Y. Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 2014;101:577–86.
- [7] Kim Y, Choi BT, Lee YT, Park DI, Rhee SH, Park KY, et al. Resveratrol inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human breast carcinoma MCF-7 cells. *Oncol Rep* 2004;11:441-6.
- [8] Pocar P, Augustin R, Fischer B. Constitutive expression of CYP1A1 in bovine cumulus oocyte-complexes in vitro: mechanisms and biological implications. *Endocrinology* 2004;145:1594–601.
- [9] Jeong MH, Yang KM, Jeong DH, Lee CG, Oh SJ, Jeong SK, Lee KW, Jo YR, Jo WS. Protective activity of a novel resveratrol analogue, HS-1793, against DNA damage in 137Cs-irradiated CHO-K1 cells. *J Radiat Res* 2014;55:464-75.

- [10] Dib PRB, Franco DCZ, Locatelli TSA, Oliveira LG, Lima LL, Oliveira PS. Avaliação da atividade antitumoral *in vitro* de uma série inédita de análogos do resveratrol. Congresso Mineiro de Farmácia 2016, Juiz de Fora; p.80.
- [11] Franco DCZ, Locatelli TZA, Esteves B, Melo J, Lacerda LM, Santos LMJ. Avaliação da atividade anti-inflamatória de uma serie inédita de análogos do resveratrol e sua eficiência no tratamento da artrite induzida por Zymosan. Congresso Mineiro de Farmácia 2016, Juiz de Fora; p.12.
- [12] Szende B, Tyihák E, Király-Véghely Z. Dose-dependent effect of resveratrol on proliferation and apoptosis in endothelial and tumor cell cultures. *Exp Mol Med* 2000;32:88–92.
- [13] Kuwajerwala N, Cifuentes E, Gautam S, Menon M, Barrack ER, Reddy GP. Resveratrol induces prostate cancer cell entry into s phaseand inhibits DNA synthesis. *Cancer Res* 2002;62:2488–92.
- [14] Hardy K, Handyside AH, Winston RM. The human blastocyst:cell number, death and allocation during late preimplantation devel-opment *in vitro*. *Development* 1986;107:597–604.
- [15] Gjørret, JO, Knijn HM, Dieleman SJ, Avery B, Larsson LI, Maddox-Hyttel P. Chronology of apoptosis in bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro*. *Biol Reprod* 2003;69:1193–1200.
- [16] Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol Reprod Dev* 2002;61:57-66.
- [17] Koo DB, Kang YK, Choi YH, Park JS, Kim HN, Oh KB. Aberrant allocations of inner cell mass and trophectoderm cells in bovine nuclear transfer blastocysts. *Biol Reprod* 2002;67:487–92.
- [18] Van Soom A, Boerjan ML, Bols PE, Vanroose G, Lein A, Coryn M. Timing of compaction and inner cell allocation in bovineembryos produced *in vivo* after superovulation. *Biol Reprod* 1997;57:1041–49.
- [19] Mucci N, Aller J, Kaiser GG, Hozbor F, Cabodevila J, Alberio RH. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology* 2006; 65:1551-62.

- [20] Lazzari G, Wrenzycki C, Herrmann D, Duchi R, Kruip T, Niemann H, Galli C. Cellular and molecular deviations in bovine *in vitro* produced embryos are related to the large off spring syndrome. *Biol Reprod* 2002;67:767-75.
- [21] Barceló-Fimbres M, Seidel Jr GE. Effects of fetal calf serum, phenazine ethosulfate and either glucose or fructose during *in vitro* culture of bovine embryos on embryonic development after cryopreservation. *Mol Reprod Dev* 2007;74:1395-405.
- [22] Dorland M, Gardner DK, Trounson AO. Serum in synthetic oviduct fluid causes mitochondrial degeneration in ovine embryos. *J Reprod Fertil* 1994;13:70.
- [23] Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 2002;1:234-8.
- [24] Salzano A, Albero G, Zullo G, Neglia G, Abdel-Wahab A, Bifulco G, Zicarelli L, Gasparrini B. Effect of resveratrol supplementation during culture on the quality and cryotolerance of bovine *in vitro* produced embryos. *Anim Repr Sci* 2014 ;151:91–96.
- [25] Sudano MJ. The effect of fetal calf serum concentrations upon the *in vitro* Bos taurus indicus x Bos Taurus taurus crossbred embryo production and the cytoplasmic lipid accumulation. *Vet e Zootec* 2011;18:123-134.

4 REFERÊNCIAS

AGARWAL, A. *et al.* Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: from molecular mechanisms to health implications. **Antioxidants & Redox Signaling**, Ohio, v. 10, n. 8, p. 1375-1403, aug. 2008.

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

AGARWAL, A.; DURAIRAJANAYAGAM, D.; DU, P. S. S. Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, Ohio, v. 12, n. 12, p. 112, nov. 2014.

AITKEN, R. J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. **Journal of Reproduction and Fertility**, Edinburgh, v. 98, n. 1, p. 257-265, may 1993.

ALI, A. A.; BILODEAU, J. F.; SIRARD, M. A. Antioxidant requirement for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. **Theriogenology**, Quebec, v. 59, n. 3-4, p. 939-949, feb. 2003.

BAUR, J. A.; SINCLAIR, D. A. Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. **Nature Reviews Drug Discovery**, Boston, v. 5, n. 6, p. 493–506, may 2006.

BETTS, D. H.; MADAN, P. Permanent embryo arrest: molecular and cellular concepts. **Molecular Human Reproduction**, Guelph, v. 4, n. 8, p. 445-453, aug. 2008.

BLONDIN, P.; COENEN, K.; SIRARD, M-A. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. **Journal of Andrology**, Canada, v. 18, p. 454-460, jan. 1997.

CALVIN, H. I.; GROSSHAN, K.; BLAKE, E. J. Estimation and manipulation of glutathione levels in prepubertal mouse ovaries and ova: relevance to sperm nucleus transformation in the fertilized egg. **Gamete Research**, New York, v.14, n. 14, p.265-275, mar. 1986.

COMIZZOLI, P.; WILDT, D.; PUKAZHENTHI, B. *In vitro* compaction of germinal vesicle chromatin is beneficial to survival of vitrified cat oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, Washington, v. 44, n. 2, p. 269-274, jul. 2009.

COMPORTI, M. Three models of free radical induced cell injury. **Chemico-Biological Interactions**, Siena, v. 72, n. 1-2, p. 1-56, nov. 1989.

CROCOMO, LF. *et al.* Produção de embriões *in vitro*: estresse oxidativo e antioxidantes. **Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 19, n. 4, p. 470-479, dez. 2012.

De MATOS, DG. *et al.* Effect of glutathione stimulation during *in vitro* maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. **Theriogenology**, Buenos Aires, v. 57, n. 2, 1443-1451, feb. 2012.

Di EMIDIO, G. *et al.* SIRT1 signalling protects mouse oocytes against oxidative stress and is deregulated during aging. **Human Reproduction**, Catania, v. 29, n. 9, p.2006–2017, sept. 2014.

DIB, PRB. *et al.* Avaliação da atividade antitumoral *in vitro* de uma série inédita de análogos do resveratrol. **CRFMG**, Congresso Mineiro de Farmácia, Juiz de Fora, mar. 2016. p. 80.

DUMOLLARD, R.; DUCHEN, M., CARROLL, J. The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. **Current Topics Development Biology**, London, v. 77, n. 7, p. 21–49, feb. 2007.

DURANTHON, V.; WATSON, A. J.; LONERGAN, P. Preimplantation embryo programming: transcription, epigenetics, and culture environment. **Reproduction**, France, v. 135, n. 2, p. 141–150, feb. 2008.

FERREIRA, A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 1-16, mar. 1997.

FRANCO, D. C. Z. *et al.* Avaliação da atividade anti-inflamatória de uma serie inédita de análogos do resveratrol e sua eficiência no tratamento da artrite induzida por Zymosan. **CRFMG**, Congresso Mineiro de Farmácia, Juiz de Fora, mar. 2016. p. 12.

FUNAHASHI, H. *et al.* Pronuclear formation and intracellular glutathione content of *in vitro* matured porcine oocytes follow in *gin vitro* fertilization and/or electrical activation. **Zygote**, Okayama, v. 3, n. 3, p. 273-281, dec. 1995.

GASPARRINI, B. *et al.* Enrichment of *in vitro* maturation medium for buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes with thiol compounds: Effects of cystine on glutathione synthesis and embryo development. **Theriogenology**, Naples, v. 65, n. 2, p. 275-287, jun. 2006.

GIBLIN, W.; SKINNER, M. E.; LOMBARD, D. B. Sirtuins: guardians of mammalian healthspan. **Trends in Genetics**, United State, v. 30, n. 7, p. 271-286, jul. 2014.

GUÉRIN, P.; EL MOUATASSIM, S.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction**, France, v. 7, n. 2, p. 175-189, apr. 2001.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Seminars in Hematology**, Jerusalem, v. 26, n. 4, p. 277-285, oct. 1989.

HOSSEINI, S. M. *et al.* Antioxidant supplementation of culture medium during embryo development and/or after vitrification-warming; which is the most important? **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, Isfahan, v. 26, n. 6, p. 355-364, jun. 2009.

HUANG, F. J.; CHIN, T. Y.; CHAN, W. H. Resveratrol protects against methylglyoxal-induced apoptosis and disruption of embryonic development in mouse blastocysts. **Toxicology**, Kaohsiung, v. 28, n. 8, p. 431-441, jul. 2013.

JEONG, M. H. *et al.* Protective activity of a novel resveratrol analogue, HS-1793, against DNA damage in 137Cs-irradiated CHO-K1 cells. **Journal of Radiation Research**, Republic of Korea, v. 55, n. 3, p. 464-475, may 2014.

KATAYAMA, M. *et al.* Improved fertilization and embryo development resulting in birth of live piglets after intracytoplasmic sperm injection and *in vitro* culture in a cysteine-supplemented medium. **Theriogenology**, Columbia, v. 67, n. 4, p. 835-847, aug. 2007.

KAWAMURA, Y. *et al.* Sirt3 protects *in vitro*-fertilized mouse preimplantation embryos against oxidative stress-induced p53-mediated developmental arrest. **The Journal Clinical Investigation**, Tokyo, v. 120, n. 8, p. 2817-2828, aug. 2010.

KIM, Y. *et al.* Resveratrol inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human breast carcinoma MCF-7 cells. **Oncology Reports**, Korea, v. 11, n. 2, p. 441-446, feb. 2004.

KOBAYASHI, M.; ASAKUMA, S.; FUKUI, Y. Blastocyst production by *in vitro* maturation and development of porcine oocytes in defined media following intracytoplasmic sperm injection. **Zygote**, Obihiro, v. 15, n. 2, p. 93-102, may 2007.

KOBAYASHI, M.; LEE E. S.; FUKUI Y. Cysteamine or beta-mercaptoethanol added to a defined maturation medium improves blastocyst formation of porcine oocytes after intracytoplasmic sperm injection. **Theriogenology**, Obihiro, v. 65, n. 6, p. 1191-1199, sept. 2006.

KODE, A. *et al.* Resveratrol induces glutathione synthesis by activation of Nrf2 and protects against cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells. **American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology**, New York, v. 294, n. 3, p. 478-488, mar. 2008.

KWAK, S. S. *et al.* The effects of resveratrol on porcine oocyte *in vitro* maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and *in vitro* fertilization. **Theriogenology**, Chungbuk, v. 78, n. 1, p. 86–101, jul. 2012.

LIM, J. M.; LIOU, S. S.; HANSEL, W. Intracytoplasmic glutathione concentration and the role of β -mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryos. **Theriogenology**, United States, v. 46, n. 1, p. 429-439, mar. 1996.

LIMA, E. S.; ABDALLA D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 293-303, dez. 2001.

LIU, Z.; FOOTE, R. H. Effects of amino acids on the development of *in vitro* matured *in vitro* fertilized bovine embryos in a simple protein-free medium. **Human Reproduction**, New York, v. 10, n. 11, p. 2985-2929, nov. 1995.

LUBERDA, Z. The role of glutathione in mammalian gametes. **Reproductive Biology**, Kortowo, v. 5, n. 1, p. 5-17, mar. 2005.

LUVONI, G. C.; KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B. G. Improvement in bovine embryo production *in vitro* by glutathione-containing culture media. **Molecular Reproduction and Development**, Milano, v. 43, n. 4, p. 437-443, apr. 1996.

MACMILLAN-CROW, L.A.; CRUTHIRDS, D. L. Invited review: manganese superoxide dismutase in disease. **Free Radical Research**, United State, v. 34, n. 4, p. 325-336, apr. 2001.

MARTÍN-ROMERO, F. J. *et al.* Contribution of culture media to oxidative stress and its effect on human oocytes. **Reproductive BioMedicine Online**, Badajoz, v. 17, n. 5, p. 652-661, nov. 2008. Disponível em: [http://www.rbmoonline.com/article/S1472-6483\(08\)00300-0](http://www.rbmoonline.com/article/S1472-6483(08)00300-0) > Acesso em: 01 out. 2016.

McBRIDE, J. M.; KRAEMER, W. J. Free radicals, exercise and antioxidants. **The Journal of Strength & Conditioning Research**, Brisbane, v. 13, n. 2, p. 175-183, apr. 1999.

MEISTER, A. Selective modification of glutathione metabolism. **Science**, New York, v. 220, n. 4596, p. 472-477, apr. 1983.

MELLO, F. A. C.; HOFFMAN, M. E.; MENEHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochemical Journal**, São Paulo, v. 218, n. 1, p. 273-275, feb. 1983.

NASR-ESFAHANI, M. H.; AITKEN, J. R.; JOHNSON, M. H. Hydrogen peroxide levels in mouse oocyte and early cleavage stages embryos developed *in vitro* or *in vivo*. **Development**, Cambridge, v. 109, n. 2, p. 501-507, jun. 1990.

NONOGAKI, T. *et al.* Effects of superoxide dismutase on mouse *in vitro* fertilization and embryo culture system. **Journal of Assisted Reproduction Genetics**, Kyoto, v. 572, n. 1, p. 87-96, apr. 2006.

NONOGAKI, T. *et al.* Protection from oxidative stress by thioredoxin and superoxide dismutase of mouse embryos fertilized *in vitro*. **Hum Reproduction**, Kyoto, v. 6, n. 9, p. 1305-1310, oct. 1991.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology Medicine**, Stockholm, v. 31, n. 11, 1287-1312, dec. 2001.

OLSON, S. E.; SEIDEL, G. E. Culture of *in vitro*-produced bovine embryos with vitamin E improves development *in vitro* and after transfer to recipients. **Biology of Reproduction**, Colorado, v. 62, n. 2, p. 248–252, feb. 2000.

PARK, S. J. *et al.* Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. **Cell**, Bethesda, v. 148, n. 3, p. 421-433, feb. 2012.

PERVAIZ, S.; HOLME, A. L. Resveratrol: its biologic targets and functional activity. **Antioxidants & Redox Signaling**, Singapore, v. 11, n. 11, p. 2851-2897, nov. 2009.

PIROLA, L.; FRÖJDÖ, S. Resveratrol: one molecule, many targets. **IUBMBLife**, Oullins, v. 60, n. 5, p. 323–332, may 2008.

POCAR, P.; AUGUSTIN, R.; FISCHER, B. Constitutive expression of CYP1A1 in bovine cumulus oocyte-complexes *in vitro*: mechanisms and biological implications. **Endocrinology**, v. 145, p. 1594-1601, apr. 2004.

Robb EL, Page MM, Wiens BE, Stuart JA. Molecular mechanisms of oxidative stress resistance induced by resveratrol: Specific and progressive induction of MnSOD. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Ontario, v. 367, n. 2, p. 406–412, mar. 2008.

SALZANO, *et al.* Effect of resveratrol supplementation during culture on the quality and cryotolerance of bovine *in vitro* produced embryos. **Animal Reproduction Science**, Naples, v. 151, n. 3-4, p. 91–96, dec. 2014.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira Medicina do Esporte**, São Paulo, v. 10, n. 4, p. 308-313, ago. 2004.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense - review. **European Journal of Biochemistry**, Germany, v. 215, n. 2, p. 213-219, jul. 1993.

SILVA, E. *et al.* Antioxidant supplementation during *in vitro* culture improves mitochondrial function and development of embryos from aged female mice. **Reproduction, Fertility and Development**, Colorado, v. 27, n. 6, p. 975-983, jul. 2015.

STRADAIOLI, G. *et al.* Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. **Theriogenology**, Udine, v. 67, n. 3-4, p. 1249-1255, aug. 2007.

TAKAHASHI, M. *et al.* Promoting effect of beta mercaptoethanol on *in vitro* development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos. **Biology of Reproduction**, Kumamoto, v. 66, p. 562-567, oct. 2002.

TAKAHASHI, M. Oxidative stress and redox regulation on *in vitro* development of mammalian embryos. **Journal of Reproduction and Development**, Kumamoto, v. 58, n. 1, p. 1-9, dec. 2012.

TAKEO, S. *et al.* Age-associated changes in gene expression and development competence of bovine oocytes, and a possible countermeasure against age-associated events. **Molecular Reproduction and Development**, Atsugi, v. 80, n. 7, p. 508-521, jul. 2013.

WAKAI, T.; FISSORE, R. A. Ca (2+) in mammalian oocytes/eggs. **Journal of Cell Science**, United States, v. 53, n. 24, p. 63-67, dec. 2013.

WANG, F. *et al.* Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryo-onic development after *in vitro* fertilization. **Fertility and Sterility**, Republic of China, v. 101, n. 2, p. 577–586, feb. 2014.

WILDING, M. *et al.* Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. **Human Reproduction**, Naples, v. 16, n. 5, p. 909–917, may 2001.

YUAN, Y. *et al.* Identification of developmental competence-related genes in mature porcine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, Urbana, v. 78, n. 8, p. 565–575, aug. 2011.

ZHANG, L. *et al.* Sirt2 functions in spindle organization and chromosome alignment in mouse oocyte meiosis. **The FASEB Journal**, Jiangsu, v. 28, n. 3, 1435–1445, mar. 2014.

ANEXO 1 – NORMAS DA REVISTA THERIOGENOLOGY

Introduction

Please consult this Guide for Authors for further details on the requirements for submitting your paper to *Theriogenology*. The guidelines described in this document should be adhered to carefully, to ensure high-quality and rapid publication of your manuscript.

Aims and Scope

Theriogenology is an international, peer-reviewed journal that publishes papers regarding the study of reproduction in domestic and non-domestic mammals, birds, reptiles, and fish. *Theriogenology* publishes only material that has never been previously published and is not currently being considered for publication elsewhere; the exception would be limited disclosure (e.g. publication of an abstract or in the proceedings of a scientific conference, with limited circulation).

Types of Articles

Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review Articles should cover subjects within the scope of the journal that are of active current interest. They are usually invited, but prospective Authors may contact the Editors with proposals.

Letters to the Editor offering comment or useful critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editors. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.

Page charges

This journal has no page charges.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements



Before You Begin

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; [Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals](#). Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If there are no conflicts of interest then please state this: 'Conflicts of interest: none'. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [CrossCheck](#).

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made **only before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the

request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of [existing agreements](#) are available online. After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Publishing Campus

The Elsevier Publishing Campus (www.publishingcampus.com) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture

of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/therio/>.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.



Preparation

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Pages and lines should be numbered.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered

1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. Since an abstract is often presented separately from the article, it must be able to stand alone. For this reason, references should

generally be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if their use is essential, they must be defined at their first mention in the abstract itself. Abstracts must be limited to a single paragraph with no more than 2,500 keystrokes (characters plus spaces).

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references; therefore, do not include them on the title page, as a footnote to the title, etc.. List individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.), sources of financial support, and donations of products and materials.

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult [IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents](#) for further information.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced.

Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;

- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left. See further under Electronic artwork.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication,

etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/theriogenology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Reference to a website:

[4] Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK,

<http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>; 2003 [accessed 13 March 2003].

Reference to a dataset:

[dataset] [5] Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1; 2015.

<https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (J Am Med Assoc 1997;277:927–34) (see also [Samples of Formatted References](#)).

Journal Abbreviation Source

Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal

abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>; List of serial title word

abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>; CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB in total. Any single file should not exceed 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

RESEARCH DATA

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. Before submitting your article, you can deposit the relevant datasets to *Mendeley Data*. Please include the DOI of the deposited dataset(s) in your main manuscript file. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available](#). Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Virtual Microscope

The journal encourages authors to supplement in-article microscopic images with corresponding high resolution versions for use with the Virtual Microscope viewer. The Virtual Microscope is a web based viewer that enables users to view microscopic images at the highest level of detail and provides features such as zoom and pan. This feature for the first time gives authors the opportunity to share true high resolution microscopic images with their readers. [More information and examples](#). Authors of this journal will receive an invitation e-mail to create microscope images for use with the Virtual Microscope when their manuscript is first reviewed. If you opt to use the feature, please contact virtualmicroscope@elsevier.com for instructions on how to prepare and upload the required high resolution images.

Additional Style Notes

Please use the following words, phrases, abbreviations, and stylistic conventions

- Avoid the word "injected," (e.g., "Cows were injected with cloprostenol") but include the generic name, proprietary name, dosage and route of administration (e.g., "Cows were treated with cloprostenol [Estrumate 500 µg im]").
- Either cite a P value (recommended for Abstract and for Results) or use the term 'significant' (recommended for Discussion), but generally avoid doing both.
- Terms with a specific statistical meaning (i.e. significant, tended and correlated), should only be used in a strict statistical context.
- Numbers less than 10 are written as a word, unless followed by an abbreviation for unit of measure, e.g. five embryos, 5 min

Use the following expressions

- transrectal palpation, not rectal palpation
- nucleus transfer, not nuclear transplant
- estrus (noun) synchronization, but, estrous (adjective) behavior
- sperm can be used as both noun and adjective
- 120 to 125, not 120-125
- treatment by period, not treatment X period
- gravity: 100 X g (in lieu of speed for centrifugation)
- magnification: X 100
- identification number of an animal: No. 10, but 30 animals: n = 30
- 3 d, Day 3 (define Day 0)

Standard definitions

- oogonium: female gamete before meiosis
- oocyte, primary: female gamete from onset of the first maturation division (meiosis) to extrusion of the first polar body
- oocyte secondary: female gamete from onset of second meiosis to extrusion of the second polar body
- ovum: female gamete from the end of both meiotic divisions until the union of the male and female pronuclei (differs from the common use of ovum as a general term for any female gamete)
- germinal vesicle: nucleus of the ovum
- zygote: a fertilized ovum, from fusion of the male and female gamete to completion of first cleavage
- embryo: a conceptus from the 2-cell stage to the stage when cell migration and differentiation are largely complete
- fetus: a conceptus after organogenesis is mostly complete (primarily increasing in size)
- conceptus: an embryo or fetus with all its membranes and accessory structures
- abortion: expulsion of a conceptus incapable of independent life
- premature parturition: expulsion (before full term) of a conceptus capable of independent life
- stillbirth: avoid this term (use fetal death or abortion)

Abbreviations

Never use an abbreviation to start a sentence. Some abbreviations may be used anywhere else, including the manuscript's title and in figures, table titles and legends, without definition; others may not be used in the title, but may be used in the text without definition. In general, abbreviations must be defined when used for the first time (this may be avoided in the ABSTRACT if necessary to conserve space). To make reading the paper more pleasant, avoid using excessive abbreviations and acronyms; instead use short synonyms, for instance: for "Cesarean section" instead of "CS" use "section" or "hysterotomy."

The following abbreviations may be used in the text without definition (note that abbreviations exclude periods):

AI	ANOVA	ADP	ATP	BSA
cAMP	CL	DEAE-cellulose	DMSO	DNA
eCG	EDTA	EGF	ELISA	FSH
GH	GnRH	hCG	HEPE	ShMG
IVC	IVF	IVM	LH	MOET
MSH	mRNA	NAD	NADH	PBS
PGF _{2α}	PGFM	PIPES	PRID	PRL
RIA	RNA	SDS-PAGE	SCNT	TRH
TRIS	tRNA	TSH		

Units of Measure

cpm - counts per min

dpm - disintegrations per min

g - gram

ga - gauge of hypodermic needle

h - hour

kg - kilogram
 L - liter
 mL - milliliter
 µL - microliter
 m - meter
 min - minute
 mo - month
 s - second
 v:v - volume ratio
 wk - week
 wt/vol - weight per volume
 y - year

Routes of treatment

id - intradermal
 im - intramuscular
 iu - intrauterine
 iv - intravenous
 sc - subcutaneous
 po - oral

Statistical expressions

ANOVA - analysis of variance
 CV - coefficient of variation
 df - degrees of freedom
 F - variance ratio
 NS - not significant
 P - probability
 SD - standard deviation
 SEM - standard error of the mean
 r - correlation coefficient
 r^2 - coefficient of regression

Additional information

- For issues of style and format not addressed here, please consult *Scientific Style and Format: The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers*, Sixth Edition.
- For spelling, word formation and divisions, plurals, possessives, meanings and usage, consult the CBE Manual or a current English language (collegiate-level or higher) dictionary.
- For conflicts between instructions in this Guide and any of the references, the Guide takes precedence. Do not hesitate to contact the Editorial Office if you have any questions regarding preparation of your manuscript.



After Acceptance

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.



Author Inquiries

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).