



PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS UTILIZANDO SÊMEN CONGELADO/DESCONGELADO ADICIONADO DE EXTRATO NATURAL (NP) AO MEIO DILUENTE - RESULTADOS PARCIAIS

Matheus Ramos Rosin

Mestrando no Programa de Pós-Graduação em Saúde, bem-estar e produção animal sustentável na Fronteira Sul (PPG-SBPAS) da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) e bolsista da CAPES

Camila Keterine Gorzelanski Trenkel

Professora do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS)

Isabeli Pastore

Discente do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS)

Julia Mara Frigo

Discente do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS)

Jonatas Cattelam

Professor do curso de Medicina Veterinária e do programa de pós-graduação (PPG-SBPAS) da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS)

Dalila Moter Benvegnú

Professora do curso de Nutrição e do programa de pós-graduação (PPG-SBPAS) da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS)

Joaquim M. Garcia

Professor do programa de pós-graduação (PPG-SBPAS) da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS)

Adalgiza Pinto Neto

Professora do curso de Medicina Veterinária e do programa de pós-graduação (PPG-SBPAS) da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS)

1. Introdução

A produção in vitro de embriões (PIVE) representa uma das principais ferramentas da biotecnologia reprodutiva na bovinocultura, permitindo o aproveitamento de gametas de alto valor genético e a multiplicação rápida de indivíduos superiores (VIANA et al., 2018). Essa técnica tem sido amplamente aplicada para acelerar o melhoramento genético de rebanhos, tanto de corte quanto leite, além de possibilitar o uso estratégico de doses reduzidas de sêmen e a combinação de diferentes touros para uma mesma doadora (OLIVEIRA et al., 2023).

Apesar dos avanços, um dos maiores desafios da PIVE é o controle do estresse oxidativo durante a manipulação dos gametas e embriões. A exposição a oxigênio, luz e



variações de temperatura pode gerar espécies reativas de oxigênio (EROs), comprometendo a viabilidade celular e a taxa de desenvolvimento embrionário (CROCOMO et al., 2012; RIBEIRO et al., 2022). A utilização de antioxidantes nos diluentes seminais e nos meios de cultivo embrionário tem se mostrado uma estratégia promissora para mitigar esses efeitos deletérios (TAMURA et al., 2013).

Dentro deste contexto, compostos naturais com propriedades antioxidantes, como extratos ricos em polifenóis e taninos, têm despertado interesse por oferecerem proteção celular sem os possíveis efeitos adversos de antioxidantes sintéticos (SOTO-HERAS & PARAMIO, 2020). No entanto, ainda são escassos os estudos avaliando diretamente a eficácia desses extratos naturais sobre a qualidade do sêmen criopreservado e sua influência nos índices de clivagem e blastocisto na PIVE bovina.

Este estudo propõe avaliar o efeito de diferentes concentrações de um extrato natural com potencial antioxidante (NP) adicionado ao diluidor de sêmen bovino congelado. Busca-se compreender se esse aditivo pode contribuir para a melhoria da viabilidade espermática e, consequentemente, para o aumento das taxas de clivagem e formação de blastocistos. Contudo existem limitações na validação experimental de substâncias antioxidantes naturais na reprodução assistida bovina, área ainda pouco explorada em relação a esse tipo específico de composto.

2. Metodologia

O experimento está sendo conduzido no Laboratório de Reprodução Animal (LABRA), SUHVU, *Campus* Realeza da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), em parceria com um laboratório privado de PIVE localizado em Francisco Beltrão – PR. Como utiliza ovários de fêmeas bovinas oriundas de abatedouros comerciais, não há necessidade de submissão à CEUA.

Os ovários são coletados em frigorífico no município de Marmeleiro – PR e transportados em solução fisiológica 0,9% a 37–38 °C, para preservação da viabilidade celular durante o transporte, conforme descrito por Ramos et al., (2006). No laboratório, são lavados com NaCl 0,9% estéril, e os folículos visíveis (2–8 mm) são aspirados com seringa e agulha 18G. Os complexos *Cumulus Oophorus* (COCs) são selecionados de acordo com critérios morfológicos (graus I, II e III) (OLIVEIRA et al., 2023).



A maturação dos COCs ocorre por 22–24 horas em criotubos com meio de maturação base (TCM-199, TL, heparina e SOF) ou meio comercial (BioKlone®), incubados a 38,5 °C em atmosfera com 5% de CO₂ (SPECKHART et al., 2023). A fertilização *in vitro* é realizada com sêmen tratado com diferentes concentrações de extrato natural antioxidante (NP – 0%; 0,5%; 0,75% e 1%), utilizando gotas de 40 µL de meio FIV.

Os espermatozoides são capacitados por gradiente de Percoll® (90% e 45%), técnica que promove melhores resultados pós-descongelamento segundo Duma et al., (2025), e avaliados por análise espermática assistida por computador (CASA), como padronizado O'Meara et al., 2022. Após 18–22 horas, os zigotos são transferidos para cultivo em gotas de meio SOF recobertas por óleo mineral, em incubadora com atmosfera controlada (5% CO₂ / 5% O₂ / 90% N₂), e a clivagem é avaliada 48 horas após a fecundação. A taxa de blastocisto é observada no sétimo dia de cultivo (SPECKHART et al., 2023).

3. Resultados e discussão

Os resultados para o grupo controle, considerando o meio base e o comercial, foram 21 e 24 COCs totais/viáveis, 61,66% e 56,04% de taxa de clivagem, 48,33% e 38,35% de formação de blastocisto, respectivamente. Ao se utilizar o sêmen acrescido de 0,5% de NP, observou-se média de 23 e 23,5 COCs totais/viáveis; 54,46% e 53,09% de taxa de clivagem; 12,28% e 16,79% de formação de blastocisto, ao se utilizar o meio base e comercial, respectivamente.

Ao se utilizar o sêmen acrescido de 0,75% de NP, encontrou-se média de 21,5 e 23 para COCs totais/viáveis; 44,08% e 51,96% para taxa de clivagem; 19,33% e 14,22% para formação de blastocisto, em meio base e comercial, respectivamente. Quando se utilizou do sêmen acrescido de 1% de NP, a média encontrada foi de 21 e 22 COCs totais/viáveis; 30,35% e 67,85% para taxa de clivagem; 12,5% e 3,57% para a taxa de formação de blastocisto, em meio base e comercial, respectivamente.

Importante destacar que até onde se tem conhecimento, não foram encontrados estudos científicos que avaliem especificamente o extrato NP na produção de embriões *in vitro*. Dessa forma, as comparações são com estudos de substâncias similares e não



exatamente com NP.

Os resultados parciais indicam efeito inibitório nas taxas de produção de blastocistos com a crescente concentração do extrato natural adicionado no sêmen congelado. No estudo realizado por Lin et al., (2025) o grupo de sêmen tratado com 25 μ M de curcumina não apresentou diferenças significativas na fertilização em comparação com o grupo controle não tratado ($p>0,05$), e o grupo de 25 μ M apresentou uma taxa de blastocisto significativamente aumentada ($p<0,05$).

As taxas de clivagem no meio base nas concentrações de 0,75% e 1,0% foram inferiores. Entretanto, as taxas de produção de blastocistos se mantiveram mais estáveis no meio Base em relação ao meio comercial. Lin et al., (2025) obteve como resultado a aprovação da cúrcuma como um inibidor a produção de espécies reativas de oxigênio e aumentando a atividade de enzimas antioxidantes.

Outro fato importante na formação embrionária *in vitro* é o controle das espécies reativas de oxigênio. O estudo de revisão sistemática de De Paula Junior (2025) traz uma breve descrição de fatores que podem interferir na viabilidade do embrião após sofrer danos oxidativos, como a produção intracelular ou até por interações externas, meios de cultura, incubadora. O estudo ainda destaca a importância do controle de condições de cultura junto ao uso de antioxidantes, no sêmen e em meios de cultura.

4. Considerações finais

A inclusão do NP (0,5 ou 0,75 ou 1,0%) no diluidor de sêmen tende a afetar a produção de blastocisto nos dois meios testados (Base e Comercial). No entanto, o número de rotinas precisa ser ampliado para subsidiar essa percepção.

Referências

CROCOMO, Letícia Ferrari et al. Produção de embriões *in vitro*: estresse oxidativo e antioxidantes. **Veterinária e zootecnia**, p. 470-479, 2012.

DE PAULA JUNIOR, Marcio Gonçalves; SIQUEIRA, Adriano Felipe Perez. Estresse Oxidativo Do Sêmen Bovino Na Produção In Vitro De Embriões. **Revista Acadêmica Online**, v. 11, n. 55, p. e975-e975, 2025.

LIN, H. et al. Impact of Curcumin on Frozen Bovine Sperm Quality and *In Vitro* Bovine



Oocyte Maturation. **Vet. Sci.**, 12, 441, 2025

OLIVEIRA, M. S. et al, In vitro production of parthenogenetic embryos from cryopreserved goat oocytes: literature review. **Research, Society and Development, [S. l.]**, v. 12, n. 2, p. e15012240059, 2023.

O'MEARA, Ciara et al. The effect of adjusting settings within a Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) system on bovine sperm motility and morphology results. **Animal Reproduction**, v. 19, p. e20210077, 2022.

RAMOS, Alessandra de Almeida et al. Efeito do transporte no desenvolvimento de embriões bovinos cultivados in vitro a fresco ou reaquecidos após vitrificação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 2285-2289, 2006.

RIBEIRO, V. H. A. et al. Avaliação da qualidade do sêmen bovino criopreservado com diluidores de origem animal e vegetal. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 10, p. 66182–66190, 6 out. 2022.

VIANA, J. H. M. et al. A historical perspective of embryo-related technologies in South America. **Animal Reproduction, Brasília**, v. 15, n. 1, p. 963-970, 2018.

SOTO-HERAS, Sandra; PARAMIO, Maria-Teresa. Impact of oxidative stress on oocyte competence for in vitro embryo production programs. **Research in Veterinary Science**, v. 132, p. 342-350, 2020.

TAMURA, H et al. Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle. **Endocrine journal**, v. 60, n. 1, p. 1-13, 2013.

SPECKHART, Savannah L.; WOOLDRIDGE, Lydia K.; EALY, Alan D. An updated protocol for in vitro bovine embryo production. **STAR protocols**, v. 4, n. 1, p. 101924, 2023.

Agradecimentos: Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos e aos Laboratórios Sêminna Embriões e BioKlone, parceiros desse estudo.