

Estado da publicação: O preprint foi submetido para publicação em um periódico

Ácido α -lipóico e l-arginina na produção in vitro de embriões ovinos

Beatriz Cavalcanti de Freitas, Jossimara de Melo Silva, Damaris Raquel Pires dos Santos, Érika Karoline de Oliveira Aureliano, Andreza Mayara Carneiro Lima, Paulo Ricardo Vieira da Silva, Luana Kealy Pimentel de Oliveira, Mabel Freitas Cordeiro, Edilson Soares Lopes Júnior

<https://doi.org/10.1590/SciELOPreprints.6001>

Submetido em: 2023-04-29

Postado em: 2023-05-05 (versão 1)

(AAAA-MM-DD)

ÁCIDO A-LIPÓICO E L-ARGININA NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES OVINOS

BEATRIZ CAVALCANTI DE FREITAS

ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-1073-1555>

UNIVASF - Universidade Federal do Vale do São Francisco – Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

Correspondência: beatrizcfreitas2@hotmail.com

JOSSIMARA DE MELO SILVA

ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-5237-7152>

UNIVASF - Universidade Federal do Vale do São Francisco – Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

DAMARIS RAQUEL PIRES DOS SANTOS

ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-5269-7983>

UNIVASF - Universidade Federal do Vale do São Francisco – Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

ÉRIKA KAROLINE DE OLIVEIRA AURELIANO

ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-3875-2494>

UNIVASF - Universidade Federal do Vale do São Francisco – Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

ANDREZA MAYARA CARNEIRO LIMA

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6192-5937>

UNIVASF - Universidade Federal do Vale do São Francisco – Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

PAULO RICARDO VIEIRA DA SILVA

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0480-4802>

UNIVASF - Universidade Federal do Vale do São Francisco – Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

LUANA KEALY PIMENTEL DE OLIVEIRA

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6440-5515>

UNIVASF - Universidade Federal do Vale do São Francisco – Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

MABEL FREITAS CORDEIRO

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1963-7311>

UNIVASF - Universidade Federal do Vale do São Francisco – Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

EDILSON SOARES LOPES JÚNIOR

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4790-8134>

UNIVASF - Universidade Federal do Vale do São Francisco – Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do ácido α -lipóico na maturação *in vitro* e da l-arginina na fertilização *in vitro* de oócitos para produção *in vitro* de embriões ovinos. Desta forma, foram realizadas colheitas de oócitos oriundos de ovários obtidos em abatedouro através do método de aspiração folicular com bomba de vácuo, que foram divididos em cinco grupos de maturação: CON, sem adição de antioxidante, grupo CIS, com cisteamina como fonte antioxidante e os grupos ALA5, ALA10 e ALA20, contendo as concentrações de 5, 10, e 20 μ M de ácido α -lipóico. Após 24h de maturação, os oócitos foram avaliados quanto à ocorrência e grau de expansão das células do cumulus. Os oócitos do melhor grupo MIV foram destinados à fertilização *in vitro* (FIV), sendo, portanto, incluídos em gotas com meio de fertilização *in vitro*, juntamente com os espermatozoides selecionados e capacitados, resultando nos seguintes grupos: CON, sem adição de capacitador agente; grupo HEP, com heparina como fonte de capacitor; e grupos ARG5, ARG10 e ARG20, onde a FIV ocorreu no mesmo meio HEP, substituindo a heparina por L-arginina 5, 10 e 20 mM, respectivamente. Os resultados foram expressos em porcentagem e as variáveis de expansão das células do cumulus e número de estruturas clivadas foram comparadas por meio do teste qui-quadrado do software Epi Info (Epi Info 7.2.5, Atlanta, GA, EUA, 2021). Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$. Em relação à expansão das células do cumulus, todos os grupos apresentaram 100% de expansão. Avaliando os graus de expansão das células do cumulus, na categoria de expansão total observou-se que os grupos ALA5 e ALA20 apresentaram a mesma proporção de CCO com expansão total que o grupo CIS ($P < 0,05$), porém se observa que há uma tendência de queda de estruturas com expansão total quando os antioxidantes foram utilizados. Em relação às estruturas clivadas, foi possível identificar que não houve diferenças estatísticas em relação às estruturas clivadas, entre os grupos CON, HEP, ARG5 e ARG10. Contudo, também foi observado que o uso de 20 mM de L-arginina reduziu o percentual de estruturas clivadas quando comparado ao grupo ARG10 ($P < 0,05$).

Palavras-chave: antioxidante, PIV, oócito, ovelha, zigoto.

ALPHA-LIPOIC ACID AND L-ARGININE ON *IN VITRO* PRODUCTION OF OVINE EMBRYOS

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the effect of α -lipoic acid on *in vitro* maturation and of l-arginine on *in vitro* fertilization of oocytes for *in vitro* production of sheep embryos. Thus, the ovaries were collected at a local slaughterhouse and the oocytes collected by the method of follicular aspiration with a vacuum pump were divided equally into five maturation groups: CON, without addition of antioxidant; CIS group, with cysteamine as an antioxidant source; and the groups ALA5, ALA10 and ALA20, containing concentrations of 5.0, 10.0 and 20.0 μ M of ALA. After 24h of maturation, the oocytes were evaluated concerning occurrence and degrees of expansion of the cumulus cells. The oocytes of the best IVM group were destined for *in vitro* fertilization (IVF). The selected and capacitated sperm were included in five groups: CON, without addition of capacitator agent; HEP group, with heparin as a capacitator source; and ARG5, ARG10 and ARG20 groups, where IVF occurred in the same HEP medium, replacing heparin with 5 mM, 10 mM and 20 mM L-arginine, respectively. The results were expressed as a percentage and the variables of cumulus cell expansion and number of cleaved structures were compared using the chi-square test in Epi Info software (Epi Info 7.2.5, Atlanta, GA, USA, 2021). Results were considered significant when $P < 0.05$. Regarding the expansion of cumulus cells all groups showed 100% expansion, on the total expansion category of COCs it was observed that ALA5 and ALA20 groups did not present the same proportion of COCs with total expansion as CIS group. After *in vitro* fertilization (IVF), there were no statistical differences in relation to the cleaved structures between CON, HEP, ARG5 and ARG10 groups. However, it was also observed that the use of 20.0 mM of L-arginine reduced the percentage of cleaved structures when compared to the ARG10 group ($P < 0.05$).

Key words: antioxidant, IVP, oocyte, sheep, zygote.

ÁCIDO α -LIPOICO Y L-ARGININA EN LA PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES OVINOS

RESUMEN: El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del ácido α -lipoico en la maduración *in vitro* y la l-arginina en la fecundación *in vitro* de ovocitos para la producción *in vitro* de embriones ovinos. Así, se recolectaron ovocitos de ovarios obtenidos de mataderos mediante el método de aspiración folicular con bomba de vacío, los cuales se dividieron en cinco grupos de maduración: CON, sin adición de antioxidante, grupo CIS, con cisteamina como fuente antioxidante y los grupos ALA5, ALA10 y ALA20, que contienen concentraciones de 5, 10 y 20 μ M de ácido α -lipoico. Después de 24 h de maduración, se evaluó la aparición y el grado de expansión de las células del cúmulo en los ovocitos. Los ovocitos del mejor grupo MIV fueron destinados a fecundación *in vitro* (FIV), siendo por tanto incluidos en gotas con medio de fecundación *in vitro*, junto con los espermatozoides seleccionados y capacitados, resultando en los siguientes grupos: CON, sin adición de agente capacitador; grupo HEP, con heparina como fuente de condensadores; y los grupos ARG5, ARG10 y ARG20, donde se produjo la FIV en el mismo medio HEP, reemplazando la heparina por L-arginina 5, 10 y 20 mM, respectivamente. Los resultados se expresaron en porcentajes y las variables expansión celular del cúmulo y número de estructuras escindidas se compararon mediante la prueba chi-cuadrado del software Epi Info (Epi Info 7.2.5, Atlanta, GA, USA, 2021). Los resultados se consideraron significativos cuando $P < 0,05$. En cuanto a la expansión de las células del cúmulo,

todos los grupos mostraron 100% de expansión. Evaluando los grados de expansión de las células del cúmulo, en la categoría de expansión total, se observó que los grupos ALA5 y ALA20 presentaron la misma proporción de CCO con expansión total que el grupo CIS ($P < 0.05$), sin embargo se observa que hay una tendencia a la baja de las estructuras con plena expansión cuando se utilizan antioxidantes. En cuanto a las estructuras escindidas, fue posible identificar que no hubo diferencias estadísticas en relación a las estructuras escindidas, entre los grupos CON, HEP, ARG5 y ARG10. Sin embargo, también se observó que el uso de L-arginina 20 mM redujo el porcentaje de estructuras escindidas en comparación con el grupo ARG10 ($P < 0.05$).

Palabras clave: antioxidante, cigoto, PIV, ovocito, oveja.

INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* (PIV) de embriões é uma biotecnologia que compreende as etapas de maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV). A PIV apresenta um grande potencial de inovação na pecuária, com impacto significativo na produção de alimentos e na geração de riqueza para o setor do agronegócio no Brasil. (1).

Esta biotecnologia de produção animal apresenta diversas vantagens, tais como o auxílio no melhoramento genético animal em tempo reduzido, a possibilidade de obtenção de embriões a partir de fêmeas pré-púberes, lactantes, senis ou com problemas reprodutivos, bem como a contribuição para a compreensão do desenvolvimento dos mamíferos, com aplicações que variam desde o tratamento terapêutico da falha reprodutiva humana até a potencialização da biotécnica de transferência de embriões e o aprimoramento de técnicas como a transgenia (2).

No entanto, a PIV é afetada por espécies reativas de oxigênio (ERO) durante a sua execução. Em condições ideais, as ERO têm efeito positivo, promovendo a competência dos oócitos e embriões a partir da geração de energia (3). Entretanto, em altos níveis de concentração, as ERO induzem estresse oxidativo intracelular que pode causar injúrias moleculares em oócitos e embriões ovinos (4).

Além disso, a capacitação espermática é crucial durante a FIV, pois é o processo responsável por tornar aptos os espermatozoides para a fecundação dos oócitos (5). No entanto, poucas pesquisas foram conduzidas acerca do espermatozoide dentro do sistema de PIV, especialmente relacionadas à adição de agentes capacitores em meios de FIV.

Nesse contexto, a suplementação de compostos antioxidantes e de capacitação espermática nos meios de MIV e fecundação *in vitro* é fundamental para o controle da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e para o aumento das taxas de fecundação (4,6). Componentes alternativos com função antioxidante e de capacitação espermática têm sido utilizados na PIV, tais como o ácido α -lipóico (ALA) e a L-arginina (ARG).

O ácido α -lipóico é uma molécula de dissulfeto de ocorrência natural, trata-se de um poderoso antioxidante que exerce efeitos benéficos em pacientes com câncer avançado por reduzir o nível das ERO, aumentando a atividade da glutatona peroxidase (7). O ALA atua como uma coenzima importante para enzimas dentro da mitocôndria, desempenhando um papel crucial na regulação da sua função e eliminando os radicais livres (8). A suplementação de ALA no meio de maturação *in vitro* reduz a apoptose, regula positivamente o crescimento e as enzimas antioxidantes nos complexos cumulus-oócito, com efeitos benéficos descritos na MIV de cabras, bovinos e suínos (9, 10, 11, 12).

Já a L-arginina (ARG) é um aminoácido que desempenha uma importante função na motilidade espermática e induz a capacitação e reação acrossômica em várias espécies de mamíferos, sendo seu efeito descrito em bovinos e búfalos (13, 14, 15). A ARG atua como substrato para a enzima óxido nítrico-sintase durante a produção de óxido nítrico, que por sua vez atua como um importante sinalizador para induzir as mudanças bioquímicas necessárias no

espermatóide para que ele seja capaz de fecundar o oócito, participando assim da capacitação e da reação acrossômica (16, 17).

Este trabalho, portanto, tem como objetivo avaliar o efeito do ácido α -lipóico na maturação *in vitro* e da L-arginina na fertilização *in vitro* de oócitos para a PIV de embriões ovinos.

MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado após aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), sendo registrado sob o protocolo de N° 0004/310122.

Os meios e reagentes para colheita, avaliação, maturação e fecundação *in vitro* de oócitos, bem como cultivo *in vitro* de embriões foram adquiridos na Sigma Aldrich Brasil®.

O experimento ocorreu no Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal (LAFIBRA), do Campus de Ciências Agrárias, na Universidade Federal do Vale do São Francisco, em Petrolina-PE.

Foram utilizados ovários ovinos obtidos do Matadouro Público Municipal de Petrolina, Pernambuco, logo após o abate de ovelhas Sem Padrão Racial Definido (SPRD), imediatamente após o abate. Os ovários foram transportados até o LAFIBRA em uma temperatura entre 33°C e 34°C, dentro de 1 hora, em solução de NaCl 0,9%, contendo 0,05 g de pentabiótico/L, sendo o pentabiótico composto por estreptomicina básica, dihidroestreptomicina básica, benzilpenicilina benzatina, benzilpenicilina procaína e benzilpenicilina potássica. No LAFIBRA, os ovários foram lavados, três vezes, em solução salina aquecida, retirados os tecidos adjacentes e mantidos em banho-maria, a 34°C. Para a colheita dos complexos cumulus-oócitos (CCO), foi utilizada uma bomba de vácuo, a 5 mL/min, agulha 18G e o meio de recuperação composto por TCM 199 com 25 mM de HEPES, suplementado com 500 UI de penicilina, 0,5 mg de estreptomicina, 1,25 μ g de anfotericina, soro fetal bovino (SFB) e 5 UI/mL de heparina. Logo após a colheita, os CCO foram dispostos no meio de recuperação, vertidos em placas de petri de 100 mm, analisados sob estereomicroscópio e qualificados de acordo com Freitas, Melo (18), sendo selecionados, para a maturação *in vitro*, os de Graus I e II, ou seja, oócitos com citoplasma levemente granulado, com múltiplas camadas de cumulus (Grau I) ou com, no mínimo, uma a três camadas uniformes de células do cumulus (Grau II).

Após a seleção e classificação oocitária, os CCO de melhor qualidade foram mantidos em meio de recuperação até o momento da maturação, quando foram divididos em cinco grupos: grupo CON, com CCO imersos em meio composto de TCM-199, suplementado com 500 UI de penicilina, 0,5 mg de estreptomicina, 1,25 μ g de anfotericina, 0,2 mM de piruvato de sódio, 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB), 10 ng/mL de fator de crescimento epidérmico (EGF), 10 UI/mL de gonadotrofina coriônica equina (eCG) e 1 μ g/mL de estradiol.; grupo CIS, os CCO foram imersos no meio do grupo CON + 100 μ M de cisteamina; nos grupos ALA5, ALA10 e ALA20 os CCO foram inclusos no meio do grupo CON, mas contendo 5 μ M, 10 μ M e 20 μ M de ácido α -lipóico, respectivamente. Os CCO foram dispostos em placa de petri de 100 mm, em número de 15 CCO por gota de 75 μ L de meio MIV, durante 24 horas, em estufa de cultivo, a 38,5°C, em uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Após a MIV, os oócitos foram considerados maduros quando apresentaram expansão das células do cumulus. Além disso, os CCO maduros foram avaliados quanto ao grau de expansão das células do cumulus, classificando-os conforme a metodologia de Aghaz et al. (19) em: total (Grau 1), moderado (Grau 2) e leve (Grau 3).

O sêmen utilizado na fecundação *in vitro* (FIV) foi colhido através de vagina artificial, a partir de um carneiro com fertilidade comprovada. O sêmen foi disposto em cima de uma coluna de Percoll 45%/90%. Os espermatozoides móveis foram selecionados por centrifugação, a 700G, por 15 minutos. O precipitado foi resuspenso em 2 mL de meio de FIV (SOF®),

suplementado com 500 UI de penicilina, 0,5 mg de estreptomicina, 1,25 ug de anfotericina, 10% de soro de ovelha em estro, 10 ug/mL de hipotaurina e 1 mg/mL de heparina sódica) e lavado por centrifugação (100G; 5 minutos). O novo precipitado foi resuspenso em 2 mL de meio FIV. A concentração final foi de 1×10^6 espermatozoides/mL, em 50 μ L/gota de meio FIV, em placa de petri de 100 mm, sob óleo mineral. Somente os oócitos maduros provenientes do melhor grupo de MIV e os espermatozoides selecionados foram incluídos nas gotas (75 μ L) de FIV, onde foram subdivididos em: grupo CON, composto por oócitos maduros e espermatozoides, imersos em gotas de 50 μ L de meio SOF®, suplementado com 500 UI de penicilina, 0,5 mg de estreptomicina, 1,25 ug de anfotericina, 10% de soro de ovelha em estro, 10 ug/mL de hipotaurina; grupo HEP, composto por oócitos maduros e espermatozoides imersos em gotas de 50 μ L de meio CON, suplementado com 10 μ g/mL de heparina sódica; e grupos ARG5, ARG10 e ARG20, onde a FIV ocorreu no mesmo meio CON, incluindo 5 mM, 10 mM e 20 mM de L-arginina, respectivamente. A FIV ocorreu por 18 a 20 horas, em estufa de cultivo, a 38,5°C, com atmosfera umidificada, contendo 5% de CO₂. As estruturas foram consideradas fecundadas quando apresentaram clivagem embrionária, o que foi avaliado, somente, após a etapa de cultivo *in vitro* de presumíveis zigotos.

Após a FIV, os presumíveis zigotos foram submetidos à sucessivas pipetagens em meio de CIV (SOF®, suplementado com 3 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), 500 UI de penicilina, 0,5 mg de estreptomicina e 1,25 ug de anfotericina), para remoção das células do cumulus, ou seja, para seu desnudamento. Os presumíveis zigotos, após o desnudamento, foram cultivados, por 48 h, em meio de CIV, sob óleo mineral, em placas de petri, contendo de 10 a 15 estruturas por gota, em estufa de cultivo, a 38,5°C, com atmosfera umidificada, contendo 5% de CO₂. O número de estruturas clivadas foi registrado no fim do período de cultivo, avaliados quanto a taxa de clivagem, sob um microscópio invertido (BEL INV-100®; BEL, São Paulo, Brasil).

Os resultados foram expressos na forma de porcentagem e as variáveis de graus de expansão das células do cumulus e número de estruturas clivadas foram comparadas usando o teste do Qui-quadrado no software Epi Info (Epi Info 7.2.5, Atlanta, GA, EUA, 2021). Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com relação à expansão das células do cumulus estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1. Graus de expansão de células do cumulus (%) de oócitos ovinos maturados *in vitro* sem a presença de antioxidantes (CON) ou na presença de cisteamina (CIS) ou de ácido α -lipoico (ALA5; ALA10; ALA20).

Grupos	Nº de CCO I e II	Taxa de expansão % (n)	Grau de expansão % (n)		
			Total	Moderado	Leve
CON	75	100 (75/75)	33,3 (25/75) ^{Aab}	46,7 (35/75) ^{Ba}	20 (15/75) ^{ABb}
CIS	75	100 (75/75)	16 (12/75) ^{BCc}	52 (39/75) ^{Ba}	32 (24/75) ^{Ab}
ALA 5	75	100 (75/75)	20 (15/75) ^{ABb}	46,7 (35/75) ^{Ba}	33,3 (25/75) ^{Aab}
ALA 10	75	100 (75/75)	8 (6/75) ^{Cb}	74,7 (56/75) ^{Aa}	17,3 (13/75) ^{Bb}
ALA 20	75	100 (75/75)	17,3 (13/75) ^{BCb}	54,7 (41/75) ^{Ba}	28 (21/75) ^{ABb}

^{A,B,C} Letras maiúsculas indicam diferenças na mesma coluna ($P < 0,05$). ^{a,b,c} Letras minúsculas indicam diferenças na mesma linha ($P < 0,05$).

Com relação à expansão das células do cumulus, todos os grupos apresentaram 100% de expansão (Tabela 1). Ao analisar a comparação entre os grupos de tratamento, na categoria

de expansão total, observou-se que os grupos ALA5 e ALA20 apresentaram a mesma proporção de CCO com expansão total que o grupo CIS, indicando que a suplementação de ALA não teve efeito significativo na expansão total das células do cumulus ($P < 0,05$).

Já na categoria de expansão de grau moderado, o grupo ALA10 apresentou um número maior de oócitos com essa característica em comparação aos outros grupos de tratamento (Tabela 1). Isso indica que a suplementação com ALA na concentração de 10 μM pode ter um efeito positivo na expansão moderada das células do cumulus ($P < 0,05$).

Ao analisar as comparações dentro de cada grupo de tratamento, observou-se que os grupos CIS, ALA10 e ALA20 apresentaram uma maior quantidade de oócitos com expansão moderada das células do cumulus em relação aos outros grupos de tratamento (Tabela 1). Por outro lado, o grupo CON apresentou uma maior quantidade de oócitos com expansão total e moderada, enquanto o grupo ALA5 apresentou a maior quantidade de oócitos com expansão moderada e leve ($P < 0,05$).

Uma possível explicação para os resultados encontrados em relação à expansão das células do cumulus, onde todos os grupos atingiram 100% de expansão (Tabela 1), é que, talvez, o oócito ovino não seja tão exigente em relação ao uso de antioxidantes. Além disso, a presença de algumas substâncias no meio de maturação *in vitro*, como o estradiol e o fator de crescimento epidermal (EGF), pode influenciar no processo de expansão.

Maksura et al. (20) constataram que o estradiol em oócitos de búfalas e cabras é responsável por coordenar o desenvolvimento e a expansão das células do cumulus. Já o EGF regula várias funções ovarianas, incluindo as células da granulosa, ação do hormônio folículo-estimulante e aumento da maturação do oócito. Quando adicionado ao meio de maturação *in vitro*, sozinho ou em conjunto com antioxidantes, o EGF aumenta a expansão das células do cumulus e a maturação nuclear de oócitos bovinos e búfalos (21,22,23).

O ácido α -lipóico é um antioxidante potente que é capaz de eliminar espécies reativas de oxigênio, apresenta atividade quelante de metais, tem ação sinérgica com outros antioxidantes e pode impactar na expressão gênica (24). Além disso, a suplementação de ALA em meios de MIV é benéfica para a maturação *in vitro* de oócitos de várias espécies de animais, combatendo os efeitos nocivos das ERO.

Hassan et al. (9) relataram que a concentração mais efetiva de ALA para combater espécies reativas de oxigênio e melhorar as taxas de maturação de oócitos bovinos foi de 10 μM , quando adicionado ao meio de MIV. Entretanto, as concentrações ideais de ALA em meio de MIV para fornecer melhora efetiva na maturação podem variar de acordo com as espécies.

O trabalho realizado por He et al. (10) com oócitos de cabra demonstrou que a suplementação do meio de maturação *in vitro* com 25 μM de ácido alfa-lipóico pode melhorar a taxa de MIV de oócitos e a qualidade de embriões. Além disso, foi observado por Zhang et al. (8) que a concentração de 25 μM de ALA pode reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio e melhorar a qualidade dos oócitos e dos embriões de cabra, reduzindo a expressão de genes que promovem a apoptose dessas células.

Já Zavareh et al. (25) constataram que a suplementação de 100 μM de ALA em meio de MIV reduziu os níveis das espécies reativas de oxigênio em oócitos de camundongos, enquanto Kang & Hyun (11) demonstraram que o tratamento com 50 μM de ALA durante a MIV melhora a maturação citoplasmática de oócitos suínos, aumentando os níveis intracelulares de glutatona e diminuindo assim os níveis intracelulares de ERO. Nesse sentido, as concentrações mais comumente utilizadas de ALA em meios de cultivo de células estão na faixa de 10 μM a 100 μM .

Khorasgani et al. (26) relataram que a adição de 25 μM de ácido α -lipóico a 1% de etanol durante a maturação de oócitos ovinos reduziu as ERO e melhorou a qualidade dos embriões resultantes. Esse resultado é consistente, em parte, com o presente estudo, que também mostrou que a adição de ALA em meio de MIV parece aliviar o estresse oxidativo e

melhorar a expansão das células do cumulus em oócitos ovinos de grau moderado. No entanto, a suplementação com ALA neste estudo não teve efeito significativo na expansão total das células do cumulus, e as condições específicas de deste trabalho com os achados de Khorasgani et al. (26), como os componentes do meio de maturação *in vitro* e as concentrações de ALA testadas, foram diferentes.

Como não houve diferença estatística entre os grupos de tratamento em relação aos dados de maturação com expansão total das células do cumulus (Tabela 1), decidiu-se utilizar a concentração do grupo ALA5 para a maturação dos oócitos que seguiram para a FIV. Uma vez que todas essas concentrações apresentaram o mesmo efeito, optou-se por considerar a melhor relação custo-benefício, escolhendo, portanto, a menor concentração, ou seja, 5 μ M de ALA. O grupo CIS não foi escolhido para avaliação, uma vez que se trata de um meio comercial.

Os resultados obtidos com relação à taxa de clivagem após a fecundação *in vitro* estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2. Taxa de clivagem (%) após fecundação *in vitro* de oócitos maturados sem a presença de antioxidantes e sem a presença de capacitador espermático (CON), com a presença de heparina como capacitador espermático (HEP) e maturados com ácido α -lipoico 5 μ M e de L-arginina como capacitador espermático (ARG5; ARG10; ARG20).

Tratamentos	Oócitos maturados	% de clivados
CON	65	29,3 (19/65) ^{AB}
HEP	65	30,8 (20/65) ^{AB}
ARG 5	65	27,7 (18/65) ^{AB}
ARG 10	65	41,5 (27/65) ^A
ARG 20	65	23,1 (15/65) ^B

^{A,B,C} Letras maiúsculas indicam comparações na mesma coluna ($P < 0,05$).

Após a fecundação *in vitro* (Tabela 2), não foi possível identificar diferenças estatísticas em relação às estruturas clivadas, entre os grupos CON, HEP, ARG5 e ARG10. Contudo, foi observado que o uso de 20 mM de L-arginina reduziu o percentual de estruturas clivadas quando comparado ao grupo ARG10 ($P < 0,05$). Isso sugere que uma concentração de 20 mM de L-arginina pode afetar negativamente a taxa de clivagem em oócitos fertilizados *in vitro*.

A L-arginina é um aminoácido semiessencial que apresenta efeitos benéficos na função espermática. O tratamento *in vitro* com essa substância pode melhorar as variáveis de qualidade dos espermatozoides, tais como motilidade, vigor, integridade da membrana plasmática e acrossomal, atividade mitocondrial, capacitação espermática e peroxidação lipídica (14,15). Esses efeitos estão relacionados à capacidade da L-arginina de servir como substrato para a enzima óxido nítrico-sintase durante a produção de óxido nítrico. O óxido nítrico, por sua vez, é um potente mensageiro celular que participa da capacitação e da reação acrossômica dos espermatozoides (16,17)

O uso de 20 mM de L-arginina no meio de fecundação *in vitro* neste estudo prejudicou a formação de clivagem (Tabela 2), sugerindo que a suplementação desta substância, nessa concentração, pode ser tóxica para a FIV de oócitos ovinos. Esse efeito pode ser atribuído ao fato de que a ARG pode ter proporcionado uma maior produção de óxido nítrico durante a FIV, o que conseqüentemente pode ter aumentado as taxas de reação acrossômica dos espermatozoides no momento da fecundação. Altas taxas de reação acrossômica diminuem o sucesso da fecundação (27), resultando em taxas menores de clivagem. Além disso, alguns estudos mostram de que a L-arginina, até um limite de concentração, pode oferecer proteção ao espermatozoide contra danos oxidativos por meio do sistema do ácido nítrico (28,29).

No presente estudo, não foram observadas melhorias significativas nas taxas de clivagem entre os grupos CON, HEP e os grupos tratados com ARG (Tabela 2). Esses resultados diferem dos obtidos por Santana et al. (30), os quais verificaram que a adição de L-arginina ao meio de FIV resultou em maiores taxas de clivagem e blastocisto em bovinos nas concentrações de 5, 10 e 20 mM, mas reduziu as taxas com a adição de 50 mM. Por outro lado, tanto Kim et al. (31) em camundongos, quanto Silva et al. (17) em bovinos, não encontraram efeitos da adição de ARG ao meio de fecundação em nenhuma das concentrações testadas.

Vale ressaltar que os resultados de Kim et al. (31) e Silva et al. (17) podem ter sido afetados pela presença do antioxidante β -mercaptoetanol e da heparina em seus meios de FIV. O β -mercaptoetanol, por ser um antioxidante, pode ter diminuído excessivamente a produção de espécies reativas de oxigênio, que, em quantidades adequadas, são responsáveis pelo processo de fecundação. Além disso, a heparina em combinação com a arginina não apresenta um efeito benéfico aditivo em comparação com o uso de cada um desses agentes de capacitação isoladamente (17, 30, 31, 32).

Uma possível explicação para os resultados em relação às taxas de clivagem do presente estudo, onde não houve diferença entre os grupos tratados com ARG e os grupos COM e HEP (Tabela 2), é que no protocolo de nosso grupo de pesquisa, todos os grupos de tratamento continham substâncias que podem ter influenciado na capacitação espermática e, conseqüentemente, na formação de clivagens, como o soro de ovelha em estro (SOE) e a hipotaurina.

O Soro de ovelha em estro é amplamente utilizado em meios de fecundação *in vitro* de ovelhas (33), uma vez que os espermatozoides de carneiro precisam de SOE para uma capacitação bem-sucedida *in vitro* (34). Sánchez-Ajofrín et al. (35) relataram que a suplementação de 2% e 10% de SOE durante a fecundação *in vitro* de oócitos ovinos é benéfica, favorecendo a capacitação espermática e posterior fecundação, aumentando as taxas de clivagens e formação de blastocistos de qualidade.

Já a hipotaurina é uma substância que pode desempenhar o papel de induzir a reativação da motilidade espermática, inibir espécies reativas de oxigênio e estimular a capacitação espermática (36), e que quando utilizada em meio de FIV pode aumentar a taxa de penetração de espermatozoides em oócitos (37) e conseqüentemente aumentar a formação de clivagens e blastocistos.

CONCLUSÃO

O meio MIV, em ovinos, suplementado com EGF e Estradiol, parece não necessitar de antioxidantes adicionais, como o ALA e a cisteamina. Além disso, o meio FIV, em ovinos, suplementado com soro de ovelha em estro e hipotaurina, parece não necessitar de agentes capacitantes adicionais, como a L-arginina e a heparina. São necessários mais estudos a fim de avaliar o efeito antioxidante do uso isolado do ácido alfa-lipóico ou em associação com os demais componentes do meio MIV assim como, do uso isolado da L-arginina ou em associação com os demais componentes do meio FIV na produção *in vitro* de embriões ovinos.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

DECLARAÇÃO DE DISPONIBILIDADE DE DADOS DA PESQUISA

Todo o conjunto de dados de apoio aos resultados deste estudo foi publicado no próprio artigo.

DECLARAÇÃO DE CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Autor 1 – Conceitualização, curadoria de dados, pesquisa, metodologia, administração do projeto e redação do manuscrito.

Autor 2 – Conceitualização, curadoria de dados, pesquisa, metodologia, administração do projeto e redação do manuscrito.

Autor 3 – Pesquisa e metodologia.

Autor 4 – Pesquisa e metodologia.

Autor 5 – Pesquisa e metodologia.

Autor 6 – Análise dos dados, pesquisa e metodologia.

Autor 7 – Análise dos dados e revisão final do texto.

Autor 8 – Pesquisadora supervisora responsável pela pesquisa relatada, participação ativa na análise dos dados e revisão da escrita final do manuscrito.

Autor 9 – Pesquisador supervisor responsável pela pesquisa relatada, participação ativa na análise dos dados e revisão da escrita final do manuscrito.

REFERÊNCIAS

1. Passos JRS, Guerreiro DD, Otávio KS, Santos-Neto PC, Souza-Neves M, Cuadro F, Crispo M, Bezerra MJB, Silva RF, Lima LF, Figueredo JR., Bustamante-filho IC, Menchaca A, Moura AA. Global proteomic analysis of preimplantational ovine embryos produced *in vitro*. *Reproduction in Domestic Animals*. 2022;57(7):784–97. doi:10.1111/rda.14122
2. Chaves MS, Silva JCF, Melo LM, Santos AS, Oliveira MAL, Freitas VJF. É possível incrementar o sucesso da PIVE em pequenos ruminantes? *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2021;45(4):246–52. doi:10.21451/1809-3000.rbra2021.032
3. Guevara S, Monzani PS, Santos ES, Zanin R, Ohashi OM, Miranda MS, Adona PR. Maturação *in vitro* de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2013;65(6):1616–24. doi: 10.1590/s0102-09352013000600005
4. Khazaei M., Aghaz F. Reactive Oxygen Species Generation and Use of Antioxidants during *In Vitro* Maturation of Oocytes. *International journal of fertility & sterility*. 2017;11(2): 63–70. doi: 10.22074/ijfs.2017.4995
5. Stival C, Molina LCP, Paudel B, Buffone MG, Visconti PE, Krapf D. Sperm Capacitation and Acrosome Reaction in Mammalian Sperm. *Sperm Acrosome Biogenesis and Function During Fertilization*. 2016;93–106. doi:10.1007/978-3-319-30567-7_5
6. Parrish JJ. Bovine *in vitro* fertilization: *In vitro* oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology*. 2014;81(1):67–73. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.08.005
7. Cameron NE, Cotter MA, Horrobin DH, Tritschler HJ. Effects of α -lipoic acid on neurovascular function in diabetic rats: interaction with essential fatty acids. *Diabetologia*. 1998 Mar 20;41(4):390–9. doi: 10.1007/s001250050921
8. Zhang H, Wu B, Liu H, Qiu M, Liu J, Zhang Y, Quan F. Improving development of cloned goat embryos by supplementing α -lipoic acid to oocyte *in vitro* maturation medium. *Theriogenology*. 2013;80(3):228–33. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.03.027

9. Hassan BMS, Fang X, Roy PK, Shin ST, Cho JK. Effect of Alpha Lipoic Acid as an Antioxidant Supplement during *In Vitro* Maturation Medium on Bovine Embryonic Development. *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology*. 2017;32(3):123–30. doi: 10.12750/jet.2017.32.3.123
10. He Y, Wang Y, Zhang H, Zhang Y, Quan F. Alpha-lipoic acid improves the maturation and the developmental potential of goat oocytes *in vitro*. *Reproduction in Domestic Animals*. 2021;56(4):545–54. doi:10.1111/rda.13892
11. Kang Y-H, Hyun S-H. Effect of Alpha Lipoic Acid on *in vitro* Maturation of Porcine Oocytes and Subsequent Embryonic Development after Parthenogenetic Activation. *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology*. 2017;32(4):267–74. doi: 10.12750/jet.2017.32.4.267
12. Zoheir KMA, Harisa GI, Allam AA, Yang L, Li X, Liang A, Abd-Rabou AA, Harrat AH. Effect of alpha lipoic acid on *in vitro* development of bovine secondary preantral follicles. *Theriogenology*. 2017;88:124–30. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.09.013
13. Hegazy MM, Sakr AE-AM, Abd El-Aziz AH, Swelum AA. Effect of adding different concentrations of L-arginine to Tris-yolk extender on the quality of sub-fertile ejaculates in buffalo. *Tropical Animal Health and Production*. 2021;53(1). doi: 10.1007/s11250-020-02499-w
14. Leal ACMS, Caldas-Bussiere MC, Carvalho CSP de, Viana KS, Quirino CR. Role of nitric oxide on quality of freshly ejaculated bull spermatozoa during heparin-induced *in vitro* capacitation. *Animal Reproduction Science*. 2009;116(1–2):38–49. doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.12.020
15. O’Flaherty C, Rodriguez P, Srivastava S. L-Arginine promotes capacitation and acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2004;1674(2):215–21. doi: 10.1016/j.bbagen.2004.06.020
16. Luo Y, Zhu Y, Basang W, Wang X, Li C, Zhou X. Roles of Nitric Oxide in the Regulation of Reproduction: A Review. *Frontiers in Endocrinology*. 2021;12. doi: 10.3389/fendo.2021.752410
17. Silva TVG., Silva BB, Sá ALA, Costa NN, Sampaio RV, Cordeiro MS, Santana PDPB, Adona PR, Santos SSD, Miranda MS, Ohashi OM. Influence of L-arginine during bovine *in vitro* fertilization. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2014;52:1159-1164. <http://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/30004>
18. Freitas VJF, Melo LM. *In vitro* embryo production in small ruminants. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2010;39:409–13. doi: 10.1590/s1516-35982010001300045
19. Aghaz F, Hajarian H, Shabankareh HK, Abdolmohammadi A. Effect of sericin supplementation in maturation medium on cumulus cell expansion, oocyte nuclear maturation, and subsequent embryo development in Sanjabi ewes during the breeding season. *Theriogenology*. 2015;84(9):1631–5. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.08.013
20. Maksud H, Akon N, Islam MN, Akter I, Modak AK, Khatun A, Alam MH, Hashem MA, Amin MR, Moniruzzaman M. Effects of estradiol on *in vitro* maturation of buffalo and goat oocytes. *Reproductive Medicine and Biology*. 2020;20(1):62–70. doi: 10.1002/rmb2.12350
21. Ahmed AE, Sindi RA, Yousef NA, Hussein HA, Badr MR, Syaad KMA, Al-Saeed FA, Hassaneen ASA, Abdelrahman M, Ali ME. Impact of epidermal growth factor and/or β -mercaptoethanol supplementations on the *in vitro* produced buffaloes’ embryos. *Frontiers in Veterinary Science*. 2023;10. doi: 10.3389/fvets.2023.1138220

22. Singhal S, Prasad S, Singh B, Prasad JK, Gupta HP. Effect of including growth factors and antioxidants in maturation medium used for *in vitro* culture of buffalo oocytes recovered *in vivo*. *Animal Reproduction Science*. 2009;113:44–50. doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.05.078
23. Yang XY, Jia ZW. The role of EGF-like factor signaling pathway in granulosa cells in regulation of oocyte maturation and development. *Hereditas*. 2019;41:137–145. doi: 10.16288/j.ycz.18-193
24. Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radical Biology and Medicine*. 1995;19:227–50. doi: 10.1016/0891-5849(95)00017-r
25. Zavareh S, Karimi I, Salehnia M, Rahnama A. Effect of *in vitro* maturation technique and Alpha Lipoic Acid supplementation on oocyte maturation rate: Focus on oxidative status of oocytes. *International journal of fertility & sterility*. 2016;9:442–451. doi: 10.22074/ijfs.2015.4601
26. Khorasgani AM, Moradi R, Jafarpour F, Ghazvinizadehgan F, Ostadhosseini S, Heydarnezhad A, Fouladi-Nashta AA, Nasr-Esfahani MH. Alpha-Lipoic Acid Can Overcome The Reduced Developmental Competency Induced by Alcohol Toxicity during Ovine Oocyte Maturation. *Cell journal*, 2021;23, 164–173. doi: 10.22074/cellj.2021.7071
27. Yanagimachi R. The Sperm Cell. De Jonge CJ, Barratt CLR, editors. 2017; doi: 10.1017/9781316411124
28. Bansal AK, Bilaspuri GS. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. *Veterinary Medicine International*. 2011;2011:1–7. doi: 10.4061/2011/686137
29. Srivastava S, Desai P, Coutinho E, Govil G. Mechanism of Action of L-arginine on the Vitality of Spermatozoa is Primarily Through Increased Biosynthesis of Nitric Oxide. *Biology of Reproduction*. 2006;74(5):954–8. doi: 10.1095/biolreprod.105.046896
30. Santana PPB, Silva BB, Silva TVG, Costa NN, Cordeiro MS, Santos SSD, Ohashi OM, Miranda MS. Addition of L-arginine to the fertilization medium enhances subsequent bovine embryo development rates. *Theriogenology*. 2016;85:1132–1138. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.11.027
31. Kim BH, Kim CH, Jung KY, Jeon BH, Ju EJ, Choo YK. Involvement of nitric oxide during *in vitro* fertilization and early embryonic development in mice. *Archives of Pharmacal Research*. 2004;27(1):86–93. doi: 10.1007/bf02980052
32. Delamirande E, Cagnon C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Radical Biology and Medicine*. 1993;14(2):157–66. doi: 10.1016/0891-5849(93)90006-g
33. Zhu J, Moawad AR, Wang C-Y, Li H-F, Ren J-Y, Dai Y-F. Advances in *in vitro* production of sheep embryos. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*. 2018;6:S15–26. doi: 10.1016/j.ijvsm.2018.02.003
34. García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Jiménez-Rabadán P, Ramón M, del Olmo E, Iniesta-Cuerda M, Anel-López L, Fernández-Santos M, Garde J, Soler A. Effect of different media additives on capacitation of frozen–thawed ram spermatozoa as a potential replacement for estrous sheep serum. *Theriogenology*. 2015;84(6):948–55. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.05.032
35. Sánchez-Ajofrín I, Peris-Frau P, García-Álvarez O, Fernández-Santos MDR, Montoro V, Garde JJ, Soler AJ. Serum supplementation during *in vitro* fertilization of sheep oocytes

- influences blastocyst quality through the differential abundance of mRNA transcripts. *Reproduction in Domestic Animals*. 2022;57:68–71. doi: 10.1111/rda.14161
36. Boatman DE, Bavister BD, Cruz E. Addition of hypotaurine can reactivate immotile golden hamster spermatozoa. *Journal of andrology*. 1990;11:66–72. doi: 10.1002/j.1939-4640.1990.tb01581.x
37. Hori N, Matsuda T, Ishida M, Komae H, Nagai T. Effect of Hypotaurine in Fertilization Medium on Fertilization of *In Vitro* Matured Bovine Oocytes and Their Subsequent Development. *Journal of Reproduction and Development*. 1997;43:33–40. doi: 10.1262/jrd.97-436j33

Este preprint foi submetido sob as seguintes condições:

- Os autores declaram que estão cientes que são os únicos responsáveis pelo conteúdo do preprint e que o depósito no SciELO Preprints não significa nenhum compromisso de parte do SciELO, exceto sua preservação e disseminação.
- Os autores declaram que os necessários Termos de Consentimento Livre e Esclarecido de participantes ou pacientes na pesquisa foram obtidos e estão descritos no manuscrito, quando aplicável.
- Os autores declaram que a elaboração do manuscrito seguiu as normas éticas de comunicação científica.
- Os autores declaram que os dados, aplicativos e outros conteúdos subjacentes ao manuscrito estão referenciados.
- O manuscrito depositado está no formato PDF.
- Os autores declaram que a pesquisa que deu origem ao manuscrito seguiu as boas práticas éticas e que as necessárias aprovações de comitês de ética de pesquisa, quando aplicável, estão descritas no manuscrito.
- Os autores declaram que uma vez que um manuscrito é postado no servidor SciELO Preprints, o mesmo só poderá ser retirado mediante pedido à Secretaria Editorial do SciELO Preprints, que afixará um aviso de retratação no seu lugar.
- Os autores concordam que o manuscrito aprovado será disponibilizado sob licença [Creative Commons CC-BY](#).
- O autor submissor declara que as contribuições de todos os autores e declaração de conflito de interesses estão incluídas de maneira explícita e em seções específicas do manuscrito.
- Os autores declaram que o manuscrito não foi depositado e/ou disponibilizado previamente em outro servidor de preprints ou publicado em um periódico.
- Caso o manuscrito esteja em processo de avaliação ou sendo preparado para publicação mas ainda não publicado por um periódico, os autores declaram que receberam autorização do periódico para realizar este depósito.
- O autor submissor declara que todos os autores do manuscrito concordam com a submissão ao SciELO Preprints.