

**PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS *in vitro* EM MEIO DE CULTURA COM ÁCIDO ASCÓRBICO**

Aline Consani Ferro<sup>1</sup>  
Camila da Silva<sup>1</sup>  
Renata Sanches Calegari<sup>2</sup>  
André Maciel Crespilho<sup>3</sup>  
Alicio Martins Jr.<sup>4</sup>

**RESUMO**

Este estudo foi conduzido para verificar os efeitos da adição de ácido ascórbico (AA) ao meio BARC utilizado para cultura *in vitro* de embriões bovinos. Folículos (2 a 7 mm de diâmetro) de ovários obtidos em frigorífico foram aspirados, e oócitos com no mínimo 3 a 4 camadas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo foram lavados três vezes em meio de maturação base (MM-b). Grupos de 15 a 25 oócitos foram maturados em gotas (100 µL) de MM-b, acrescido de 1 µg/mL de FSH (Folltropin) e 10% de SFB, sem PVA, por 24 horas. O meio m-DM foi utilizado tanto para o “swim-up” quanto para a fertilização *in vitro*; oócitos e espermatozóides foram co-incubados por 5 horas. A seguir, as células do *cumulus* foram removidas e prováveis zigotos foram cultivados em gotas (50 µL) de meio BARC (experimento 1), suplementado com AA nas concentrações de 0, 0,1, 1 e 10 µg/mL, durante a etapa 1 (5 a 72 horas pós-inseminação; h pi). No experimento 2 e 3, as mesmas concentrações de AA foram adicionadas ao meio BARC, respectivamente nas etapas 2 (72 a 144 h pi) e 3 (144 a 192 h pi). Oócitos e embriões foram incubados em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%, 38,5°C e atmosfera úmida. O desenvolvimento embrionário foi monitorado e oócitos maturados que fertilizaram e atingiram os estágios de mórula, blastocisto e blastocisto expandido foram registrados às 72, 144, 168 e 192 h pi, respectivamente, de acordo com as condições experimentais definidas. ANOVA e teste *t* de Bonferroni foram empregados para as análises estatísticas, com  $p < 0,05$  aceito como significativo. No experimento 1, o AA na concentração de 10 µg/mL produziu uma maior ( $p < 0,05$ ) porcentagem de mórulas (53,7%), blastocistos (37,2%) e blastocistos expandidos (28,1%) do que os demais tratamentos, com resultados similares entre estes. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os tratamentos nos experimentos 2 e 3 para qualquer um dos estágios de desenvolvimento embrionário. Concluindo, a adição de ácido ascórbico ao meio de cultura BARC aumentou a produção de embriões bovinos *in vitro*, provavelmente devido à sua função de prevenir ou diminuir os danos causados pela oxidação.

**Palavras-chave:** ácido ascórbico, cultura *in vitro*, meio de cultura, embriões, bovino.

***In vitro* PRODUCTION OF BOVINE EMBRYOS IN ASCORBIC ACID CONTAINING-CULTURE MEDIUM****ABSTRACT**

This study was carried out to verify the effects of addition of ascorbic acid (AA) to BARC medium used for *in vitro* culture of bovine embryos. Follicles (2-7 mm in diameter) from ovaries obtained from an abattoir were aspirated, and oocytes having at least 3-4 layers of unexpanded cumulus cells and homogeneous cytoplasm were washed 3 times in base maturation medium (b-MM). Groups of 15 to 25 oocytes were matured in droplets (100 µl) of b-MM with 1 µg/ml FSH (Folltropin) and 10% FCS

<sup>1</sup>Graduando do Curso de Medicina Veterinária, FOA-UNESP, Araçatuba-SP, 16050-680, Brasil. E-mail: mila.ata@ig.com.br.

<sup>2</sup>Professora Voluntária do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, FOA-UNESP, Araçatuba-SP, 16050-680, Brasil. E-mail: [renatacalegari@uol.com.br](mailto:renatacalegari@uol.com.br)

<sup>3</sup>Pós-graduando da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, FMVZ-UNESP, Botucatu, 18618-000, Brasil. E-mail: [andremacc@yahoo.com.br](mailto:andremacc@yahoo.com.br)

<sup>4</sup>Professor Adjunto do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, FOA-UNESP, Araçatuba-SP, 16050-680, Brasil. E-mail: [amartins@fmva.unesp.br](mailto:amartins@fmva.unesp.br)

Entidade Financiadora: FAPESP, processo nº 04/00107-0.

without PVA, for 24 h. Sperm swim-up and *in vitro* fertilization were performed in m-DM; oocytes and spermatozoa were co-incubated for 5 h. After that, cumulus cells were removed and presumptive zygotes were cultured in droplets (50  $\mu$ l) of BARC (experiment 1), supplemented with AA at concentrations of 0, 0.1, 1, and 10  $\mu$ g/ml, during the step 1 (5 to 72 hours post-insemination; h pi). In experiment 2 and 3 the same concentrations of AA were added to BARC medium, respectively in step 2 (72 to 144 h pi) and step 3 (144 to 192 h pi). Oocytes and embryos were incubated at 5% CO<sub>2</sub>, at 38,5°C, under a humidified atmosphere. Embryonic development was monitored and matured oocytes that fertilized and reached morula, blastocyst and expanded blastocyst stages were recorded at 72, 144, 168, and 192 h pi, respectively, according to the defined experimental conditions. ANOVA and Bonferroni t-test were used for the statistical analysis, with  $p < 0.05$  taken as significant. In experiment 1, AA at concentration of 10  $\mu$ g/ml yielded a higher ( $p < 0.05$ ) percentage of morulae (53.7%), blastocysts (37.2%), and expanded blastocysts (28.1%) than the other treatments, with similar results among these. No significant differences were observed among treatments in experiments 2 and 3 for any embryonic developmental stages. In conclusion, the addition of ascorbic acid to BARC culture medium increased *in vitro* bovine embryo production, probably due to its function of preventing or decreasing the oxidation damage.

**Key words:** ascorbic acid, *in vitro* culture, culture medium, embryos, bovine.

## PRODUCCIÓN DE EMBRIONES BOVINOS *in vitro* EN MEDIO DE CULTURA CON ÁCIDO ASCÓRBICO

### RESUMEN

Este estudio fue realizado para verificar los efectos de agregar ácido ascórbico (AA) al medio BARC de cultura *in vitro* de embriones bovinos. Folículos (2 a 7 mm de diámetro) de ovarios obtenidos en frigorífico fueron aspirados y oocitos con un mínimo de 3 a 4 capas de células de *cumulus* y citoplasma homogéneo fueron lavados tres veces en un medio de maduración base (MM-b). Grupos de 15 a 25 oocitos fueron madurados en gotas (100  $\mu$ l) de MM-b, adicionadas de 1  $\mu$ g/ml de FSH (Follitropin) y un 10% de SFB, sin PVA, por 24 horas. El medio m-DM se utilizó tanto para el "swim-up" como para la fertilización *in Vitro*; oocitos y espermatozoides fueron co-incubados por 5 horas. A seguir, las células de *cumulus* fueron removidas y probables zigotos cultivados en gotas (50  $\mu$ l) de medio BARC (experimento 1), complementado con AA en concentraciones de 0, 0,1, 1 y 10  $\mu$ g/ml, durante la etapa 1 (5 a 72 horas pos-inseminación; h pi). En el experimento 2 y 3, iguales concentraciones de AA fueron agregadas al medio BARC, respectivamente en la etapa 2 (72 a 144 h pi) y la etapa 3 (144 a 192 h pi). Oocitos y embriones fueron incubados en estufa de CO<sub>2</sub> al 5%, 38,5°C y atmósfera húmeda. El desarrollo embrionario fue vigilado y los oocitos madurados que fertilizaron y alcanzaron los estados de mórula, blastocito y blastocito expandido fueron registrados a las 72, 144, 168 y 192 h pi, respectivamente, con base en las condiciones experimentales establecidas. ANOVA y test *t* de Bonferroni se utilizaron para análisis estadísticos, con  $p < 0,05$  como significativo. En el experimento 1, el AA en la concentración de 10  $\mu$ g/ml produjo un mayor ( $p < 0,05$ ) porcentaje de mórulas (53,7%) blastocitos (37,2%) y blastocitos expandidos (28,1%) que los de los demás tratamientos, con resultados similares entre estos. Ninguna diferencia significativa ocurrió entre los tratamientos en los experimentos 2 y 3 para cualquier uno de los estados de desarrollo embrionario. Concluyendo, al añadir ácido ascórbico al medio de cultura BARC aumentó la producción de embriones bovinos *in vitro*, probablemente a causa de su función en prevenir o disminuir los daños causados por la oxidación.

**Palabras-clave:** ácido ascórbico, cultura *in vitro*, medio de cultura, embriones, bovino.

## INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* (PIV) de embriões tem se firmado como uma biotécnica de fundamental importância para o melhoramento genético do rebanho bovino, pois possibilita uma rápida disseminação de genótipos desejáveis na população. Sendo assim, a PIV de embriões bovinos ganha um papel de destaque como técnica de reprodução assistida, justificando as inúmeras pesquisas realizadas em busca de meios e/ou de sistemas de cultura que propiciem um aumento da produção de embriões *in vitro*.

Contudo, uma infinidade de fatores pode influenciar negativamente os resultados de PIV de embriões, dentre eles, a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO); tais radicais são produzidos durante o metabolismo normal da célula (SMITH e AKINBAMIJO, 2000; DALVIT et al., 2005), em virtude do desvio de elétrons para o oxigênio, em reações de transferência de elétrons (HO et al., 1996), podendo afetar o desenvolvimento de embriões de bovinos (NAGARO et al., 1994), camundongos (UMAOKA et al., 1992) e hamsters (McKIERNAN e BAVISTER, 1990).

Segundo Gutteridge e Halliwell (1994), o estresse oxidativo na célula ocorre quando metabólitos reativos de oxigênio são produzidos mais rapidamente do que podem ser removidos pela ação dos antioxidantes. A cultura *in vitro* aumenta a concentração de O<sub>2</sub> (LUVONI et al., 1996), resultando na elevação da produção de ERO (GOTO et al., 1993; LUVONI et al., 1996).

O ácido ascórbico (vitamina C), um importante antioxidante solúvel em água (OLSON e SEIDEL, Jr., 2000), protege os tecidos contra a ação das espécies reativas de oxigênio, ou seja, contra O<sub>2</sub><sup>-</sup>, OH<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OCl<sup>-</sup>, NO e complexos oxigênio-metais (FREI et al., 1989; BUETTNER, 1992), os quais podem provocar danos ao DNA, proteínas, carboidratos, lipídeos e membranas biológicas (LUCK et al., 1995). Estudos conduzidos *in vitro* por Paker et al. (1979) e Halliwell e Gutteridge (1990) demonstraram que a vitamina C atua regenerando a vitamina E (tocoferol), a partir de radicais tocoferil, um produto resultante da interação entre o tocoferol e os radicais livres de oxigênio.

Devido à sua atividade antioxidante, o AA tem sido utilizado em diferentes espécies animais e sob diferentes condições *in vitro* e *in vivo*. Desta forma, efeito benéfico sobre o sêmen, em associação com a vitamina E, foi relatado por Beconi et al. (1993), em bovinos e por Donnelly et al. (1999), em humanos; porém, nenhum efeito desejável foi observado no sêmen humano (DONNELLY et al., 1999) e de ovino (SÁNCHEZ-PARTIDA et al., 1997) após suplementação de AA, separadamente. A administração oral de AA e vitamina E foi eficaz para diminuir a fragmentação do DNA de espermatozoides humanos (GRECO et al., 2005), e a peroxidação lipídica no testículo de ratos (SÓNMEZ et al., 2005).

Em decorrência da escassez de relatos voltados para o emprego de ácido ascórbico na etapa de cultura *in vitro* de embriões bovinos, e da ausência de estudos referentes à adição do mesmo no meio BARC ("Beltsville Agriculture Research Center"), este trabalho foi delineado para investigar os efeitos da suplementação de AA ao referido meio, em três etapas diferentes da cultura, na expectativa de aumentar a PIV de embriões bovinos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### COLHEITA DE OVÁRIOS E ASPIRAÇÃO FOLICULAR

Ovários de vacas abatidas em frigorífico foram utilizados para a realização dos experimentos. Folículos de 2 a 7 mm de diâmetro foram aspirados utilizando-se agulha calibre 18 e seringa de 10 mL; a seguir, o líquido folicular foi colocado em tubos de 15 mL, e mantidos em estufa a 39°C, por 20 minutos, para a sedimentação dos oócitos.

### SELEÇÃO E MATURAÇÃO *in vitro* (MIV)

Após o período de sedimentação, o sobrenadante foi descartado e o material decantado colocado em placa de Petri com meio MM-b, constituído de TCM-199, 2,2 mg/mL de bicarbonato de sódio, 50 µg/mL de piruvato de sódio, 50 µg/mL de sulfato de gentamicina e 1 mg/mL de álcool polivinílico. Oócitos com citoplasma homogêneo e pelo menos 3 a 4 camadas de células do *cumulus* foram selecionados e lavados três vezes em MM-b. Na seqüência, grupos de 15 a 25 oócitos foram transferidos para placa de Petri (60 x 15 mm) e maturados em gotas de 100 µL de MM-b, suplementado com 1 µg/mL de FSH (Folltropin<sup>®</sup>, Bioniche Inc., Canadá) e 10% de SFB (Nutricell<sup>®</sup>, Brasil), sem PVA. A incubação foi conduzida em estufa de cultura (Forma Scientific, Inc., USA), em

atmosfera úmida, a 38,5°C, 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 horas.

### PREPARO DO SÊMEN E FERTILIZAÇÃO *in vitro* (FIV)

O meio “modified Defined Medium” (mDM) foi utilizado tanto para o “swim-up” quanto para a FIV. Assim, duas palhetas de sêmen foram descongeladas em água a 37°C, por 30 segundos, e 0,1 mL de sêmen depositado no fundo de oito tubos de ensaio contendo 1,5 mL de mDM. Os tubos foram mantidos inclinados a 45°, por 45 minutos, quando então, 0,8 mL do sobrenadante, de cada tubo, foi removido e colocado em um tubo de 15 mL para centrifugação (1.100 x g), por 10 minutos; o “pellet” resultante foi ressuspendido em 200 µL de mDM e, a seguir, utilizado para a inseminação.

Após a MIV, os oócitos foram transferidos para gotas de m-DM, e aproximadamente 160.000 espermatozóides foram colocados em cada gota; os gametas foram co-incubados, por 5 horas, sob as mesmas condições de cultura adotadas na MIV.

### CULTURA *in vitro* (CIV)

Ao término do período de co-incubação, os prováveis zigotos (PZ) foram desnudados e transferidos para gotas de meio BARC, para as primeiras 67 horas de cultura. Decorridas 72 h pi, a clivagem foi verificada, e somente zigotos com quatro ou mais blastômeros foram colocados em gotas de meio BARC, fresco, para um período adicional de 72 horas. Às 144 h pi, os zigotos foram novamente transferidos para gotas de meio de mesma composição e cultivados por mais 48 horas. Todas as etapas de cultura foram conduzidas sob as mesmas condições de atmosfera e temperatura descritas para a MIV e FIV. O desenvolvimento embrionário foi monitorado, e porcentagens de óocitos fertilizados (F), atingindo os estágios de mórula (Mo), blastocisto (Bl) e blastocisto expandido (Bx) foram registrados às 72, 144, 168 e 192 h pi, respectivamente.

### DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

*Experimento 1:* o AA (A- 4544, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) nas concentrações de 0, 0,1, 1 e 10 µg/mL foi adicionado ao meio BARC, para cultura de PZ, no período de 5 a 72 h pi (etapa1); *experimento 2:* o AA nas concentrações de 0, 0,1, 1 e 10 µg/mL foi adicionado ao meio BARC, para cultura de embriões com 4 a 8 blastômeros, no período de 72 a 144 h pi (etapa 2); *experimento 3:* o AA nas concentrações de 0, 0,1, 1 e 10 µg/mL foi adicionado ao meio BARC, para cultura de mórulas, no período de 144 a 192 h pi (etapa 3).

### ANÁLISE ESTATÍSTICA

Cada experimento foi repetido cinco vezes e os resultados analisados por ANOVA e teste *t* de Bonferroni. Cada estágio de desenvolvimento foi tomado como número e porcentagem (n/%) de oócitos fertilizados, de zigotos (4-8 blastômeros) e de mórulas atingindo os estágios subsequentes de desenvolvimento, nos experimentos 1, 2 e 3, respectivamente. Diferenças de  $p < 0,05$  foram consideradas como significativas.

### RESULTADOS

Os efeitos da suplementação de diferentes concentrações de AA ao meio de cultura *in vitro* de embriões bovinos, em três etapas distintas da cultura, foram investigados quanto ao subsequente desenvolvimento embrionário aos estágios indicados. Os resultados de desenvolvimento de PZ em meio de cultura com AA nas concentrações de 0, 0,1, 1 e 10 µg/mL (etapa 1) são mostrados na Tabela 1.

O AA na concentração de 10 µg/mL aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) a porcentagem de mórulas (53,7%), blastocistos (37,2%) e blastocistos expandidos (28,1%) em comparação com os demais tratamentos, sem diferenças significativas entre os diferentes tratamentos para os índices de fertilização (variação de 62,7 a 69,4%); resultados similares para a porcentagem de mórulas, blastocistos e blastocistos expandidos foram observados entre os tratamentos com 0, 0,1 e 1 µg/mL de AA, cujos valores oscilaram 41,7 a 42,4%, 25,4 a 27,5% e 15,2 a 17,5%, respectivamente.

No entanto, nenhuma diferença significativa foi constatada entre os quatro tratamentos, após a adição de AA na etapa 2 da cultura (Tabela 2), considerando-se os percentuais de embriões produzidos aos estágios definidos; valores mínimos e máximos de 61,8 e 66,7%, 40,4 e 47,7% e 23,6 e 28,7% foram obtidos, respectivamente, para Mo, Bl e Bx. Da mesma forma, ao se analisar os dados da Tabela

3 (experimento 3), constata-se que os resultados de porcentagens de blastocistos (65,0, 65,5, 71,9 e 67,2%) e de blastocistos expandidos (31,7, 29,3, 33,3 e 31,30%) não diferiram entre os tratamentos, respectivamente para as concentrações de 0, 0,1, 1 e 10 µg/mL.

**TABELA 1.** Desenvolvimento de embriões bovinos *in vitro* em meio de cultura BARC suplementado com ácido ascórbico, durante o período de 5 a 72 h pi.

**TABLE 1.** *In vitro* development of bovine embryos in BARC culture medium supplemented with ascorbic acid during the period of 5 to 72 h pi.

Tratamento <i>Treatment</i> µg/ml	Oócitos <i>Oocytes</i> n	Desenvolvimento embrionário <i>Embryonic development</i>			
		Fertilizados <i>Fertilized</i> 72 h*	Mo n (%) 144 h	Bl n (%) 168 h	Bx n (%) 192 h
0	121	79 (65,3) <sup>a</sup>	51 (42,1) <sup>c</sup>	31 (25,6) <sup>e</sup>	20 (16,5) <sup>g</sup>
0,1	120	83 (69,2) <sup>a</sup>	50 (41,7) <sup>c</sup>	33 (27,5) <sup>e</sup>	21 (17,5) <sup>g</sup>
1,0	118	74 (62,7) <sup>a</sup>	50 (42,4) <sup>c</sup>	30 (25,4) <sup>e</sup>	18 (15,2) <sup>g</sup>
10,0	121	84 (69,4) <sup>a</sup>	65 (53,7) <sup>b</sup>	45 (37,2) <sup>d</sup>	34 (28,1) <sup>f</sup>

\*Desenvolvimento temporal (h pi).

*Temporal development (h pi).*

<sup>a</sup> Diferentes letras dentro de colunas mostram diferenças significativas (p<0,05).

*Different letters within columns denote significant differences (p<0.05).*

**TABELA 2.** Desenvolvimento de embriões bovinos *in vitro* em meio de cultura BARC suplementado com ácido ascórbico, durante o período de 72 a 144 h pi.

**TABLE 2.** *In vitro* development of bovine embryos in BARC culture medium supplemented with ascorbic acid during the period of 72 to 144 h pi.

Tratamento <i>Treatment</i> µg/ml	Zigotos <i>Zygotes</i> n	Desenvolvimento embrionário <i>Embryonic development</i>		
		Mo n (%) 144 h*	Bl n (%) 168 h	Bx n (%) 192 h
0	89	55 (61,8) <sup>a</sup>	36 (40,4) <sup>b</sup>	21 (23,6) <sup>c</sup>
0,1	86	54 (62,8) <sup>a</sup>	38 (44,2) <sup>b</sup>	22 (25,6) <sup>c</sup>
1,0	87	57 (65,5) <sup>a</sup>	40 (46,0) <sup>b</sup>	25 (28,7) <sup>c</sup>
10,0	90	60 (66,7) <sup>a</sup>	43 (47,7) <sup>b</sup>	24 (26,7) <sup>c</sup>

\* Desenvolvimento temporal (h pi).

*Temporal development (h pi).*

<sup>a</sup> Valores com a mesma letra dentro de colunas não diferem significativamente (p<0,05).

*Values with similar letters within columns are not significantly different (p<0.05).*

**TABELA 3.** Desenvolvimento de embriões bovinos *in vitro* em meio de cultura BARC suplementado com ácido ascórbico, durante o período de 144 a 192 h pi.

**TABLE 3.** *In vitro* development of bovine embryos in BARC culture medium supplemented with ascorbic acid during the period of 144 to 192 h pi.

AA µg/ml	Desenvolvimento embrionário <i>Embryonic development</i>		
	Mo n 144 h*	Bl n (%) 168 h	Bx n (%) 192 h
0	60	39 (65,0) <sup>a</sup>	19 (31,7) <sup>b</sup>
0,1	58	38 (65,5) <sup>a</sup>	17 (29,3) <sup>b</sup>
1,0	57	41 (71,9) <sup>a</sup>	19 (33,3) <sup>b</sup>
10,0	61	41 (67,2) <sup>a</sup>	19 (31,1) <sup>b</sup>

\* Desenvolvimento temporal (h pi).

*Temporal development (h pi).*

<sup>a</sup> Valores com a mesma letra dentro de colunas não diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).

*Values with similar letters within columns are not significantly different ( $p < 0,05$ ).*

## DISCUSSÃO

Este é o primeiro relato de suplementação de ácido ascórbico ao meio de cultura BARC, meio que tem sido utilizado para cultura de embriões obtidos a partir de transferência nuclear. A adição de 10 µg/mL de AA, na etapa 1, foi benéfica para o desenvolvimento de embriões, como demonstrado pelo aumento dos índices de mórulas, blastocistos e blastocistos expandidos.

Experimentos empregando vitaminas no meio de cultura de embriões bovinos são escassos e, na maioria das vezes, são utilizadas em variadas combinações, com diferentes propósitos. Os achados do presente estudo diferiram dos relatados por Olson e Seidel, Jr. (2000), os quais observaram uma maior porcentagem de blastocistos expandidos (17%) no meio de cultura de embriões bovinos (CDM) suplementado com vitamina E (100 µM/mL) do que nos grupos com ácido ascórbico (100 µM/mL) + vitamina E (7%) e controle (11%).

Esses resultados foram, contudo, inferiores aos 28,1% de Bx obtidos no presente trabalho, mesmo considerando uma maior concentração de AA, equivalente a 17,6 µg/mL, empregada por esses autores; no entanto, o emprego de atmosfera gasosa com O<sub>2</sub>, descrita por Olson e Seidel, Jr. (2000), pode ter influenciado nos resultados, uma vez que uma maior produção de ERO deve ter ocorrido. Tarin et al. (1998) também não observaram nenhuma diferença significativa na taxa de fertilização e desenvolvimento embrionário, em camundongos que receberam uma dieta com alta concentração de AA e vitamina E.

Todavia, os resultados do presente estudo corroboram os achados de Tarin e Trounson (1993), que demonstraram um efeito protetor do AA no meio de congelamento de embriões de camundongos, com diminuição da peroxidação lipídica; concordam, também, com os relatados por Zaken et al. (2001), os quais verificaram um efeito benéfico da combinação de vitamina C (50 µg/mL) e vitamina E (25 µg/mL) sobre o desenvolvimento de embriões de ratos, pela normalização do mecanismo de defesa antioxidante embrionário.

O AA tem a capacidade de regenerar as moléculas de  $\alpha$ -tocoferol que foram atacadas pelos radicais livres, assim como prevenir a oxidação da vitamina E, ao combater antecipadamente os radicais livres (MACHLIN e GABRIEL, 1980). Contudo, o AA pode atuar como um pró-oxidante, quando em baixas concentrações (DALVIT et al., 1998; DALVIT et al. 2005) e, portanto, reduzir metais, principalmente complexos de Fe<sup>+3</sup>, para formas que reagem com o oxigênio para produzir iniciadores da peroxidação lipídica.

O aumento da PIV de embriões obtido no presente trabalho, em decorrência da suplementação de AA ao meio de cultura, não foi observado por Blondin et al. (1997) e Dalvit et al. (2005), com adição de 50 µg/mL e 5 mmol/L de AA no meio de MIV de oócitos bovinos, respectivamente; tais pesquisadores, contudo, fizeram uso contínuo do AA no meio de cultura, diferente da adição em etapas distintas, como delineado neste estudo. Concordância ainda houve com Dalvit et al. (1998), uma vez que diferenças não ocorreram nos índices de fertilização de oócitos bovinos, após a suplementação do meio de FIV com AA (5 mM) ou vitamina E (1mg/mL). Da mesma forma, 250 µM de ácido ascórbico 2-O- $\alpha$ -glicosídeo (AA-2G), um derivado do referido ácido, influenciou no processo de maturação citoplasmática de oócitos de suínos, prevenindo o estresse oxidativo (TATEMOTO et al., 2001).

Diferente do ocorrido na etapa 1, o ácido ascórbico não afetou de modo positivo o desenvolvimento embrionário quando adicionado nos períodos de 72 a 144 h pi ou 144 a 192 h pi, sugerindo que embriões em estágios mais avançados de desenvolvimento foram menos dependentes da proteção antioxidante do AA do que os em estágios iniciais. Contudo, espécies reativas de oxigênio podem afetar o desenvolvimento de embriões de bovinos (FUKUI et al., 1991; NAGARO et al., 1994), e de outras espécies (UMAOKA et al., 1992; McKIERNAN e BAVISTER, 1990) e, assim, a ação direta do AA provavelmente foi o fator determinante para o aumento da PIV de embriões, dado que agentes antioxidantes atuam combatendo os efeitos deletérios dos radicais livres de oxigênio (BLONDIN et al., 1997).

Interessante que, de maneira semelhante, Arechiga et al. (1994) observaram que embriões de roedores, também em estágios iniciais do desenvolvimento, apresentaram maior viabilidade frente ao choque produzido pelo calor, quando a vitamina E estava presente no meio; segundo Loven (1998), o calor promove citotoxicidade, a qual é provavelmente mediada por radicais livres. Sabe-se que, altas concentrações de glicose no meio de MIV de oócitos podem aumentar a produção de ERO, afetando negativamente o desenvolvimento embrionário (HASHIMOTO et al., 2000).

Assim, na dependência do meio utilizado, determinados compostos e/ou concentrações podem levar a uma maior produção de ERO, reduzindo a ação de agentes antioxidantes. Esses radicais livres podem acumular-se rapidamente nas células que estejam se reproduzindo ativamente (SMITH e AKINBAMIJO, 2000) e, desta maneira, causar danos à sua integridade morfo-funcional. Investigações futuras, com a utilização de meios quimicamente definidos, podem elucidar efetivamente a função desempenhada pelo AA, sob as condições experimentais adotadas no presente estudo.

## CONCLUSÕES

A suplementação do meio BARC com ácido ascórbico, na etapa inicial da cultura, foi benéfica para o subsequente desenvolvimento embrionário, evidenciado pelo aumento da PIV de embriões bovinos, provavelmente devido à sua função de prevenir ou diminuir os danos causados pela oxidação e/ou interação com compostos presentes no meio de cultura.

## REFERÊNCIAS

- ARECHIGA, C.G.; EALY, A.D.; HANSEN, P.J. Efficacy of vitamin E and glutathione for thermoprotection of murine morulae. **Theriogenology**, v.41, p.1545-1553, 1994.
- BECONI, M.T.; FRANCA, C.R.; MORA, N.G.; AFFRANCHINO, M.A. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. **Theriogenology**, v.40, p.841-851, 1993.
- BLONDIN, P.; COENEN, K.; SIRARD, M.A. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. **J. Androl.**, v.18, p.454-460, 1997.
- BUETTNER, G.R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation,  $\alpha$ -tocopherol, and ascorbate. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.300, p.535-543, 1992.
- DALVIT, G.C.; CETICA, P.D.; BECONI, M.T. Effect of  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid on bovine in vitro fertilization. **Theriogenology**, v.49, p.61-627, 1998.

DALVIT, G.; LLANES, S.P.; DESCALZO, A.; INSANI, M.; BECONI, M.; CETICA, P. Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine oocyte in vitro maturation. **Reprod. Domestic Anim.**, v.40, p.93-97, 2005.

DONNELLY, E.T.; McCLURE, N.; LEWIS, E.M. The effect of ascorbate and  $\alpha$ -tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. **Mutagenesis**, v.14, p.505-512, 1999.

FREI, B.; ENGLAND, L.; AMES, B.N. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. **Med. Sci.**, v.86, p.6377-6381, 1989.

FUKUI, Y.; MCGOWAN, L.T.; JAMES, R.W.; PUGH, P.A.; TERVIT, H.R. Factors affecting the in vitro development to blastocyst of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. **J. Reprod. Fertil.**, v.92, p.125-131, 1991.

GRECO, E.; IACOBELLI, M.; RIENZI, L.; UBALDI, F.; FERRERO, S.; TESARIK, J. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. **J. Androl.**, v.26, p.349-353, 2005.

GOTO, Y.; NODA, Y.; MORI, T.; NAKANO, M. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. **Theriogenology**, v.15, p.69-75, 1993.

GUTTERIDGE, J.M.C.; HALLIWELL, B. **Antioxidants in nutrition, health and disease**. Oxford: Oxford University Press, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. The antioxidants of human extracellular fluids. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.280, p.1-8, 1990.

HASHIMOTO, S.; MINAMI, N.; YAMADA, M.; IMAI, H. Excessive concentration of glucose during in vitro maturation impairs the developmental competence of bovine oocytes after in vitro fertilization: relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents. **Mol. Reprod. Dev.**, v.56, p.520-526, 2000.

HO, Y.S.; DEY, M.S.; CRAPO, J.D. Antioxidant enzyme expression in rat lungs during hypoxia. **Am. J. Physiol.**, v.270, p.L810-L818, 1996.

LOVEN, D.P. A role for reduced oxygen species in heat-induced cell killing and the induction of thermotolerance. **Med. Hypotheses**, v.26, p.39-50, 1988.

LUCK, M.R.; JEYASEELAN, I.; SCHOLLES, R.A. Ascorbic acid and fertility. **Biol. Reprod.**, v.52, p.262-266, 1995.

LUVONI, C.; KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B.G. Improvement in bovine embryo production in vitro by glutathione-containing culture medium. **Mol. Reprod. Dev.**, v.43, p.437-443, 1996.

MACHLIN, L.J.; GABRIEL, E. Interactions of vitamin E with vitamin C, vitamin B12, and zinc. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.335, p.98-107, 1980.

McKIERNAN, S.H.; BAVISTER, B.D. Environmental variables influencing in vitro development of hamster 2-cell embryos to the blastocyst stage. **Biol. Reprod.**, v.43, p.404-413, 1990.

NAGARO, Y.; SAEKI, K.; HOSHI, M.; KAINUMA, H. Effects of oxygen concentration and oviductal epithelial tissue in the development of in vitro matured and fertilized bovine oocytes cultured in protein-free medium. **Theriogenology**, v.41, p.681-687, 1994.



OLSON, S.E.; SEIDEL JR, G.E. Culture of in vitro-produced bovine embryos with vitamin E improves development in vitro and after transfer to recipients. **Biol. Reprod.**, v.62, p.248-252, 2000.

PACKER, J.E.; SLATER, T.F.; WILSON, R.L. Direct observation of free radical interaction between vitamin E and C. **Nature**, v.278, p.737-738, 1979.

SÁNCHEZ-PARTIDA, L.G.; SETCHELL, B.P.; MAXWELL, M.C. Epididymal compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram spermatozoa. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.9, p.689-696, 1997.

SMITH, O.B.; AKINBAMIJO, O.O. Micronutrients and reproduction in farm animals. **Anim. Reprod. Sci.**, v.60-61, p.549-560, 2000.

SÖNMEZ, M.; TÜRK, G.; YÜCE, A. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. **Theriogenology**, v63, p.2063-2072, 2005.

TARIN, J.J.; TROUNSON, A.A. Effects of stimulation and inhibition of lipid peroxidation on freezing-thawing of mouse embryos. **Biol. Reprod.**, v.49, p.1362-1368, 1993.

TARIN, J.; TEN, J.; VENDRELL, F.J.; OLIVEIRA, M.N.; CANO, A. Effects of maternal ageing and dietary antioxidant supplementation on ovulation, fertilization and embryo development in vitro in the mouse. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.38, p.499-508, 1998.

TATEMOTO, H.; OOTAKI, K.; SHIGETA, K.; MUTO, N. Enhancement of developmental competence after in vitro fertilization of porcine oocytes by treatment with ascorbic acid 2-O- $\alpha$ -glucoside during in vitro maturation. **Biol. Reprod.**, v.65, p.1800-1806, 2001.

UMAOKA, Y.; NODA, Y.; NARIMOTO, K.; MORI, T. Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, v.31, p.28-33, 1992.

ZAKEN, V.; KOHEN, R.; ORNOY, A. Vitamins C and E improve rat embryonic antioxidant defense mechanism in diabetic culture medium. **Teratology**, v.64, p.33-44, 2001.

**Recebido em: 18/09/2007**

**Aceito em: 12/08/2008**