



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, CEP 64049-
550 Telefones: 3215-5856, E-mail: cienciaanimal@ufpi.edu.br

MURIEL ALVES CARVALHO

**EFEITO DO DIAZINON E TROLOX NA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES
BOVINOS**

TERESINA - PI
2022

MURIEL ALVES CARVALHO

EFEITO DO DIAZINON E TROLOX NA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

LINHA DE PESQUISA: Morfofisiologia, fisiopatologia, biotécnicas de reprodução e fisiopatologia do estresse.

Orientador: Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa

**TERESINA - PI
2022**

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial CCA
Serviço de Representação Temática da Informação

C331e Carvalho, Muriel Alves.
Efeito do diazinon e trolox na produção in vitro de embriões
bovinos / Muriel Alves Carvalho. -- 2022.
44 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Centro
de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência
Animal, 2023.
“Orientador: Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa.”

1. Organofosforado. 2. Antioxidante. 3. Toxicidade
Embrionária. I. Costa, Amilton Paulo Raposo. II. Título.

CDD 636.089

Bibliotecário: Rafael Gomes de Sousa - CRB3/1163

**EFEITO DO DIAZINON E TROLOX NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE
EMBRIÕES BOVINOS**

MURIEL ALVES CARVALHO

Dissertação aprovada em: 24/02/2022

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa (Presidente) / DMV/CCA/UFPI



Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza (Interno) / DCCV/CCA/UFPI



Profa. Dra. N. T. C. Castelo Branco (Externa) / UFMA

Dedico,

A Deus, em sua infinita bondade por sempre me conferir sabedoria.

E a todos que me amam, eu também amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por todos os dias abençoar e proteger a todos os seus filhos que merecem o teu infinito amor.

Aos meus pais Francisca Alves Pereira e Dilcon Afonso Santos Carvalho, por me proporcionarem educação em meio a tantas dificuldades. Meu irmão Gabriel Alves Carvalho. Minhas avós Maria Vieira Rosa e Maria dos Santos e Silva. Meu avô Gregório Alves Pereira (in memoriam), que nos deixou acometido do Coronavírus, saudades e Dionísio Carvalho (in memoriam). Meu Tio João Batista Carvalho (in memoriam) que sempre estará comigo. Meus tios, tias, primos e primas obrigado pelo carinho.

À Universidade Federal do Piauí (UFPI), por ser minha segunda casa por 10 anos e sempre me proporcionar o melhor para ser um grande profissional.

À CAPES, por disponibilizar recursos financeiros e bolsa de fomento, durante o período de pós-graduação.

À minha companheira, que conheci durante o mestrado, Joana D'Arc Oliveira Nascimento. Obrigado por todo apoio, força e pelas pequenas e grandes conquistas na vida.

Aos meus amigos da vida Enoque Jr, Naieff, Fernando Ferreira, Fernando Rebêlo e Lorena Conceição.

Ao meu orientador, Professor Dr. Amilton Paulo Raposo Costa que me acompanhou desde os PIBICs na graduação, pelos ensinamentos, por acrescentar na minha vida profissional atual, mas sobretudo, por permitir experiências que são e serão base para minha carreira ao longo dos anos.

Aos membros do LBRA (Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal). Nosso grande coordenador Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza, Anna Monallysa Silva de Oliveira, Sérgio Henrique Costa Júnior, Maria Luiza Lima Cordeiro, Misael das Virgens Santana, Wallisson Bruno de Moraes Pacheco, Amanda Priscila Maia Souza, Marcos Samuel, Leonardo, D. Noeme e demais servidores.

Meu muito obrigado.

"Ninguém baterá tão forte quanto a vida.
Porém, não se trata de quão forte pode bater,
se trata de quão forte pode ser atingido
e continuar seguindo em frente.
É assim que a vitória é conquistada."
(Rocky Balboa)

RESUMO

Os pesticidas organofosforados são amplamente utilizados na agricultura moderna para controle de pragas vegetais ou frutas. Eles também são usados na pecuária para controle de ectoparasitas, especialmente a *Haematobia irritans* (mosca-dos-chifres), na pecuária bovina, os brincos comerciais com 6 gramas de diazinon vêm sendo utilizados com substituição a cada seis meses. O trolox é um análogo da vitamina E solúvel em água, no qual a cauda poliisoprenóide foi substituída por uma porção carboxila. A vitamina E é considerada um importante antioxidante natural. Nos embriões bovinos, não existem estudos sobre o efeito do diazinon e seus possíveis comprometimentos. Com isso, há necessidade de estudos para avaliar se o diazinon, pode causar danos ao desenvolvimento embrionário em bovinos e se o trolox é capaz de atenuar o comprometimento causado. Foi utilizado o total de 1000 oócitos distribuídos entre dez tratamentos, cultivados em quatro repetições, no qual cada grupo conteve 25 oócitos, cultivados com Diazinon em diferentes concentrações e Trolox com uma única concentração, sendo elas G1)Controle; G2)Trolox 50 μM ; G3)Diazinon 500 μM ; G4)Diazinon 1000 μM ; G5)Diazinon 2000 μM ; G6)Diazinon 4000 μM ; G7)Diazinon 500 + Trolox 50 μM ; G8)Diazinon 1000 + Trolox 50 μM ; G9)Diazinon 2000 + Trolox 50 μM ; G10)Diazinon 4000 + Trolox 50 μM . A avaliação da taxa de clivagem foi realizada após 48 horas do início do cultivo e a formação de blastocisto após 168 horas. Foi realizada análise de variância e posteriormente teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade. Os dados foram avaliados pelo programa SigmaStat versão 3.5. Para avaliação de taxa de clivagem as concentrações testadas de Diazinon e Trolox não apresentaram resultado significativo quando comparadas ao grupo controle. Para a avaliação de blastocisto houve diferenças significativas entre os grupos para blastocisto inicial, blastocisto e total de blastocistos (TBL). Para avaliação dos graus de qualidade dos embriões, houve diferença significativa apenas para os de grau 2. Conclui-se com os resultados deste estudo que o Diazinon é potencialmente tóxico para o embrião bovino e o Trolox não demonstrou ser atenuador da toxicidade do pesticida.

Palavras-chave: Organofosforado; antioxidante; toxicidade embrionária

ABSTRACT

Organophosphate pesticides are widely used in modern agriculture to control vegetables or fruits. They are also used in livestock for control of ectoparasites, especially for *Haematobia irritans* (horn flies), in livestock, commercial headphones with 6 grams a day are not used with replacement every six months. Trolox is a water soluble vitamin E water, in which the isoprenoid tail has been replaced by a carbox moiety. Vitamin E is considered an important natural antioxidant. In bovine embryos, there are no studies on the effect of diazinon and its possible compromises. Thus, there is a need for studies to assess whether diazinon can cause damage to embryonic development in cattle and whether trolox is able to attenuate the causative impairment. A total of 1000 oocytes distributed among ten treatments were used, four were cultured with a single group of 25 oocytes, with a single group on different days and concentrated Trolox, being them G1)Control; G2) Trolox 50 μM ; G3) Diazinon 500 μM ; G4) Diazinon 1000 μM ; G5) Diazinon 2000 μM ; G6) Diazinon 4000 μM ; G7) Diazinon 500 + Trolox 50 μM ; G8) Diazinon 1000 + Trolox 50 μM ; G9) Diazinon 2000 + Trolox 50 μM ; G10) Diazinon 4000 + Trolox 50 μM . The evaluation of the cleavage rate was performed 48 hours after the beginning of the culture and the blastocyst formation after 168 hours. A variance test was performed and subsequently Duncan's test was carried out, at the level of 5% probability of analysis. Data were evaluated using the SigmaStat version 3.5 program. For the rate control group, as the Diazinon tests were produced, they did not yield test results and tests when evaluating. For blastocyst evaluation there are significant differences between groups for blastocyst, blastocyst and total cystocyst (TBL). For embryo quality grades, only for grade 2 results. It is concluded with the significant results for the evaluation of this study that Diazinon is relevant for cattle and Trolox showed a significant reduction in the evaluation of pesticide toxicity.

Keywords: Organophosphate; antioxidante; embryonic toxicity

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades físico-químicas do diazinon, adaptado de HORNSBY et al. (1996)	22
Tabela 1: Média \pm EPM da taxa de clivagem (D3) de embriões bovinos em meios de maturação, fertilização e cultivo acrescidos de diferentes doses do diazinon, com ou sem associação com Trolox.....	38
Tabela 2: Média \pm EPM da taxa de estruturas e blastocisto total (TBL) encontradas no D7 do cultivo <i>in vitro</i> em meios acrescidos de diferentes doses do diazinon, Trolox ou associação de ambos.....	39
Tabela 3. Taxa de blastocistos eclodidos observados no sétimo dia de cultivo do cultivo <i>in vitro</i> (D7) em meio acrescido de diferentes doses do diazinon, com ou sem associação com Trolox.....	40
Tabela 4. Média \pm EPM do número de embriões bovinos cultivados em meios acrescidos de diferentes concentrações do diazinon, com ou sem associação com trolox, de acordo com a classificação da qualidade.....	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da distribuição das organelas citoplasmáticas durante a maturação, fertilização e formação do zigoto bovino.....	19
Figura 2: Estrutura geral dos organofosforados, adaptado (ANVISA, 2012).....	22
Figura 3: Estrutura molecular da Vitamina E e do Trolox. Fonte: Rezk et al., (2004).....	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CCOs – Complexos cumulus-oócito

PIV – Produção *in vitro*

MIV – Maturação *in vitro*

FIV – Fertilização *in vitro*

CIV – Cultivo *in vitro*

SOF – Fluido Sintético de Oviduto

TCM199 – Meio de Cultura de Tecidos 199

ERO – Espécie reativa ao oxigênio

D500 – Diazinon 500 μM

D1000 – Diazinon 1000 μM

D2000 – Diazinon 2000 μM

D4000 – Diazinon 4000 μM

D500T50 – Diazinon 500 μM + Trolox 50 μM

D1000T50 – Diazinon 1000 μM + Trolox 50 μM

D2000T50 – Diazinon 2000 μM + Trolox 50 μM

D4000T50 – Diazinon 4000 μM + Trolox 50 μM

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	14
2.REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1. PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS	16
2.2. MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i>	17
2.3. FERTILIZAÇÃO <i>IN VITRO</i>	21
2.4. CULTIVO <i>IN VITRO</i>	22
2.5. DIAZINON	22
2.6. TROLOX	24
REFERÊNCIAS	26
CAPÍTULO I	32
EFEITO DO DIAZINON E TROLOX NA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS (Effect of diazinon and trolox on in vitro production of bovine embryos).....	32
RESUMO	33
INTRODUÇÃO	34
MATERIAL E MÉTODOS	35
RESSULTADOS E DISCUSSÃO	39
CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS	45
ANEXO 1. CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	48

1. INTRODUÇÃO

Os pesticidas organofosforados (OPs) são considerados neurotoxinas e melhor caracterizados pelo aumento da atividade colinérgica e redução da acetilcolinesterase (Low et al., 2013). A exposição excessiva aos OPs está associada à ocorrência de várias doenças crônicas humanas como câncer, Parkinson, Alzheimer, esclerose múltipla, diabetes, doenças renais, cardiovasculares e crônicas (Goindin et al., 2017). Os pesticidas organofosforados são amplamente utilizados na agricultura moderna para controle de pragas vegetais ou frutas. Eles também são usados na pecuária para controle de ectoparasitas, especialmente a *Haematobia irritans* (mosca-dos-chifres).

A *Haematobia irritans* (mosca-dos-chifres), é um ectoparasito comum nos rebanhos bovinos de todo o país. O incômodo diário causado aos bovinos pelas frequentes picadas leva a significativas perdas da produção (Bianchin et al., 2004; Byford et al., 1992; Foil; Hogsette, 1994). No Brasil, estima-se que *Haematobia irritans* cause um dano econômico de aproximadamente US \$ 3,24 bilhões por ano (Grisi et al., 2014). O controle desse ectoparasita continua sendo baseado em inseticidas químicos, aplicados diretamente nos hospedeiros, afetando principalmente moscas adultas (Campos et al., 2008).

De acordo com Domingues et al. (2012), dentre todas as vias de administração de ectoparasiticidas utilizados em bovinos naturalmente infestados por moscas, destaca-se a pulverização de corpo inteiro. No entanto, atualmente essa via vem sendo substituída pelo uso de brincos impregnados com inseticida, que são colocados na orelha dos bovinos, permitindo que o medicamento seja distribuído por difusão entre as partículas de gordura presentes na pele do animal (Vechiato et al., 2013).

O diazinon (O,O-diethyl O-2-isopropyl-6-methylpyrimidin-4-yl phosphorothioate) é um inseticida organofosforado (OP), largamente utilizado para controle de ectoparasitos no gado de corte. É aprovado para uso agropecuário no Brasil (MAPA, 2011), classificação toxicológica na classe II, sua utilização no ambiente domissanitário não é autorizado e ingestão diária aceitável é de 0,002 mg/kg p.c. (Anvisa, 2019).

Na pecuária bovina, os brincos comerciais com 6 gramas de diazinon vêm sendo utilizados como o principal mecanismo para controle da *Haematobia irritans* e outros ectoparasitas, com substituição a cada seis meses. Essa prática tornou-se um método mais viável

economicamente em relação as pulverizações por reduzir o manejo e ter maior eficiência. No entanto, o Diazinon afeta os órgãos reprodutivos em ratos, diminuindo o peso genital, reduzindo a mobilidade, viabilidade e aumenta as anormalidades morfológicas dos espermatozoides (Abd el-Aziz et al., 1994). Além disso, altera a estrutura da cromatina dos espermatozoides em ratos (Piña-Guzman et al., 2005). Em fêmeas, foi demonstrado que o Diazinon prejudica o desenvolvimento de oócitos de camundongos (Bonilla et al., 2008) e suínos, o que compromete a viabilidade, maturação (Casas et al., 2010), fertilização in vitro e desenvolvimento de embriões (Ducolomb et al., 2009)

O trolox é um análogo da vitamina E solúvel em água, no qual a cauda poli-isoprenóide foi substituída por uma porção carboxila (Thomas & Bielski., 1989). A vitamina E é considerada um importante antioxidante natural com base em suas propriedades, como a inibição da peroxidação lipídica, que é uma contribuição para a defesa antioxidante nas membranas biológicas, sendo a primeira linha de defesa contra a peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados (Evstigneeva et al., 1998)

Nos embriões bovinos, não existem estudos sobre o efeito do diazinon e seus possíveis comprometimentos. Com isso, há necessidade de estudos para avaliar se o diazinon, pode causar danos ao desenvolvimento embrionário em bovinos e se o trolox é capaz de atenuar o comprometimento causado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

Desde a sua introdução no mercado brasileiro no final da década de 90, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) atingiu sua plenitude nos últimos anos, entre os anos de 2012 e 2013 tornou-se líder mundial no uso da biotécnica (GONÇALVES e VIANA, 2019).

Atualmente, o país assume uma posição de vanguarda chegando a marca de 20 anos dos primeiros registros de transferências embrionárias *in vitro* por empresas comerciais brasileiras (VIANA et al., 2017; VIANA, 2018) produzidos não apenas em raças zebuínas de corte, mas também nos demais segmentos (GONÇALVES e VIANA, 2019). O Comitê de Recuperação de Dados da Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS) no relatório de dezembro de 2021 mostra que a América do Sul produziu 690856 embriões bovinos *in vitro*, o que corresponde à 45,42% do mercado mundial (IETS 2022).

O objetivo da PIV consiste em obter embriões viáveis de fêmeas saudáveis de alto valor genético e também aquelas que não estão mais aptas a produzir descendentes pelas técnicas convencionais. Além disso, fêmeas a partir dos seis meses de idade, gestantes até o terceiro mês ou no período pós-parto podem ser usadas como doadoras de oócitos na PIV (Bueno e Beltran, 2008).

A biotécnica de produção *in vitro* de embriões permite o contato entre o espermatozoide e o oócito fora do trato reprodutivo da fêmea, com a formação de um novo indivíduo (Gonçalves et al., 2008), possibilitando vários benefícios para a reprodução animal em setores científicos, produtivos e tecnológicos (De Bem et al., 2014; Machado et al., 2012), sendo desenvolvida a fim de propiciar condições adequadas na maturação *in vitro* de complexos cumulus-oócitos (CCOs), capacitação espermática seguida de fertilização *in vitro*, e cultivo embrionário *in vitro* (Varago et al., 2008).

Apresentando vantagens como o não-uso de tratamento hormonal para a obtenção dos complexos cumulus-oócito (CCOS), emprego de sêmen criopreservado de reprodutores diferentes para a mesma doadora oocitária, assim como a viabilização de sêmen sexado na fertilização *in vitro*, permitindo o uso da biotécnica em escala comercial (RATH e JOHNSON, 2008; VARAGO et al., 2008; MELLO et al., 2016).

A coleta de oócitos para a PIV pode ser realizada através de diversas técnicas, sendo post mortem, a partir da punção folicular oriundo de ovários obtidos de abatedouro, ou *in vivo* por meio da laparotomia ou laparoscopia via flanco, e ainda por laparoscopia vaginal ou pela

técnica da aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom *Ovum Pick Up* (OPU) (VARAGO et al., 2008).

Após a realização desses procedimentos, os oócitos serão submetidos a três processos biológicos que são mimetizados em laboratório: a maturação *in vitro*, a fecundação *in vitro* e o cultivo *in vitro* (MELLO et al., 2016). A maturação extrafolicular envolve uma série de mudanças no citoplasma e no núcleo do oócito, que visa tornar esse gameta apto a ser fecundado (MELLO et al., 2016).

A fecundação *in vitro* consiste na interação espermatozoide capacitado com o oócito para que viabilize a formação do zigoto (MELLO et al., 2016). O Cultivo *in vitro* ocorre após a fecundação, e consiste na transferência do zigoto recém-formado para um meio de cultivo que atenda suas necessidades nutricionais, possibilitando a ocorrência de inúmeras clivagens até se constituir em blastocisto (GARCIA E FERNÁNDEZ, 2012).

2.2. MATURAÇÃO IN VITRO

No processo *in vitro* de embriões, que mimetiza as condições *in vivo*, a maturação *in vitro* (MIV) consiste num método eficiente para produção de unidades competentes para utilização em técnicas de reprodução assistida, como a fertilização *in vitro*, injeção intracitoplasmática de espermatozoides (da sigla ICSI, em inglês, *intra cytoplasmic sperm injection*) e clonagem (CHILD et al., 2001; MOTA, 2013) e pode sofrer influência de diversos fatores, tais como: meio de cultivo, suplementação de proteínas, atmosfera gasosa (CO₂ e O₂), temperatura, umidade e tempo (GUEMRA et al., 2013; TIAN et al., 2014).

A MIV representa uma das etapas mais desafiadoras da PIV, uma vez que a tradução dos genes durante este período irá determinar a eficiência das modificações nucleares, citoplasmáticas e moleculares, estando estas, por sua vez, ligadas a uma série de mudanças estruturais e bioquímicas que tornam o oócito apto a ser fecundado (HARTWIG et al., 2014).

Dessa forma, alguns oócitos reassumem a meiose sem adquirir plena competência (ADONA, LEAL, 2006; GILCHRIST, THOMPSON, 2007), ou seja, ainda não adquiriram a competência do citoplasma para suportar o desenvolvimento embrionário posterior (GILCHRIST; THOMPSON, 2007). A maturação inadequada, quer seja do núcleo ou do citoplasma, impossibilita a fecundação e aumenta a ocorrência de polispermia, de partenogênese e de bloqueio do desenvolvimento embrionário *in vitro*.

O oócito, no interior do folículo, está envolto por células da granulosa, formando o complexo *cumulus*-oócito (CCO), o conjunto celular próxima à zona pelúcida é denominado

corona radiata, as células do *cumulus* participam de forma ativa no mecanismo de crescimento e maturação dos oócitos (CHAVES et al., 2010).

In vivo, enquanto o oócito está dentro de um folículo não-ovulatório, o reinício da meiose não ocorre pela inibição de fatores presentes no fluido folicular, o mecanismo inicia-se logo após o pico pré-ovulatório de LH (SIRARD et al., 1998).

No processo *in vitro*, os oócitos retornam a meiose quando são removidos dos folículos ovarianos, o que se deve, provavelmente, à remoção do sinal inibidor proveniente do folículo, tornando importante o tempo entre a aspiração e o início da maturação *in vitro* para não comprometer a capacidade de fertilização do oócito (SÁ et al., 2003) cultivados em meios específicos (MOTA, 2013).

Apesar do *cumulus* não serem essenciais para a maturação nuclear dos oócitos, a maturação citoplasmática é bastante comprometida na ausência desse tipo celular (GONÇALVES et al., 2008), melhores resultados de maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário são alcançados na presença do *cumulus*, fato que evidencia a importância destas células somáticas.

Os oócitos bovinos utilizados na PIV são em geral aspirados do interior de folículos com diâmetro entre 2 e 8 mm, antes da divergência folicular. Folículos ovarianos menores que 2mm de diâmetro geralmente não são competentes para reiniciar a meiose, enquanto folículos maiores que 8mm geralmente não são competentes devido ao fato que já estão em processo de atresia ou de maturação, comprometendo, então, sua viabilidade (PAVLOK et al., 1992; GONÇALVES, 2008).

Os oócitos possuem diferentes aspectos morfológicos que determinam sua viabilidade, várias classificações morfológicas têm sido adotadas para selecionar oócitos bovinos na tentativa de identificar os de maior viabilidade (LEIBFRIED-RUTLEDGE e FIRST, 1979). Morfológicamente, os oócitos com maior potencial de viabilidade devem apresentar ooplasma homogêneo com granulações finas, de coloração marrom e completamente envolvidos por várias camadas de células do *cumulus* dispostas de forma compacta (GONÇALVES et al., 2002).

Os oócitos destituídos da camada células do *cumulus*, ou seja, desnudos absorvem aminoácidos, açúcares e ribonucleosídeos de forma menos intensa quando comparados a oócitos envoltos por um extenso estratificado celular, por isso exibem um desenvolvimento reduzido na produção *in vitro* (GARCIA E FERNÁNDEZ, 2012).

A maturação *in vitro* leva a uma capacitação dos oócitos que passam por modificações nucleares e citoplasmáticas, rearranjo de organelas, expressão de genes que serão traduzidos em proteínas, expansão das células do *cumulus* que podem sofrer alterações pelas condições de cultivo (WARZYCH et al., 2007; WATSON et al., 2000).

In vitro, a expansão das células do *cumulus* é visível a partir das 12 horas de cultivo (SUTOVSKY et al., 1993). A presença considerável de glicosaminoglicanos nas células do *cumulus* impede a ação do estresse oxidativo dos radicais livres sobre os oócitos, evitando a redução na taxa de clivagem (LUVONI et al., 1996), e o choque térmico que bloqueia a síntese de proteínas (EDWARDS; HANSEN, 1997).

As células do *cumulus* deixam o aspecto de uma massa compacta, tornando-se uma estrutura dispersa, até a síntese da matriz intercelular mucoide. Tal processo é de suma importância para assegurar a maturação oocitária (YOKO e SATO, 2004).

Para reduzir os efeitos danosos gerados pela exposição ao ambiente atmosférico e aproximar-se das condições intrauterinas, a maturação *in vitro* é realizada em incubadoras a 38,5°C em atmosfera com 5% de CO₂ e umidade saturada durante, aproximadamente, 24 horas (GONÇALVES et al., 2008).

Dessa forma, a suplementação de diferentes substâncias aos meios de maturação é uma prática rotineira nos laboratórios de PIV. Dentre as substâncias mais empregadas, ganham destaque: piruvato de sódio, soro fetal bovino (SFB), soro de fêmea em estro, hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), estradiol (E2), fatores de crescimento, cisteamina e glutamina (BERNADI, 2005).

Além disso, os meios de maturação são acrescidos com sistemas tampões para minimizar as variações de pH, que devem permanecer entre 7,3 e 7,5 (GOTTARDI E MINGOTI, 2009). A utilização do fluido folicular e substâncias, como Butirolactona I (BLI), hipoxantina e roscovitina, que inibem temporariamente a maturação até que se inicie o cultivo *in vitro* vêm sendo utilizados com sucesso (GONÇALVES et al., 2008; SÁ et al., 2003).

A maturação nuclear ocorre entre 16 e 24 horas após o início da MIV (Figura 1; COGNIÉ et al., 2004). O período necessário para a maturação nuclear varia entre as espécies. Na espécie bovina, visualiza-se o RVG entre 7 e 12h após o reinício da meiose, a MI entre 12 e 15h, a AI e a TI de 15 a 18h e a MII de 18 a 24h.

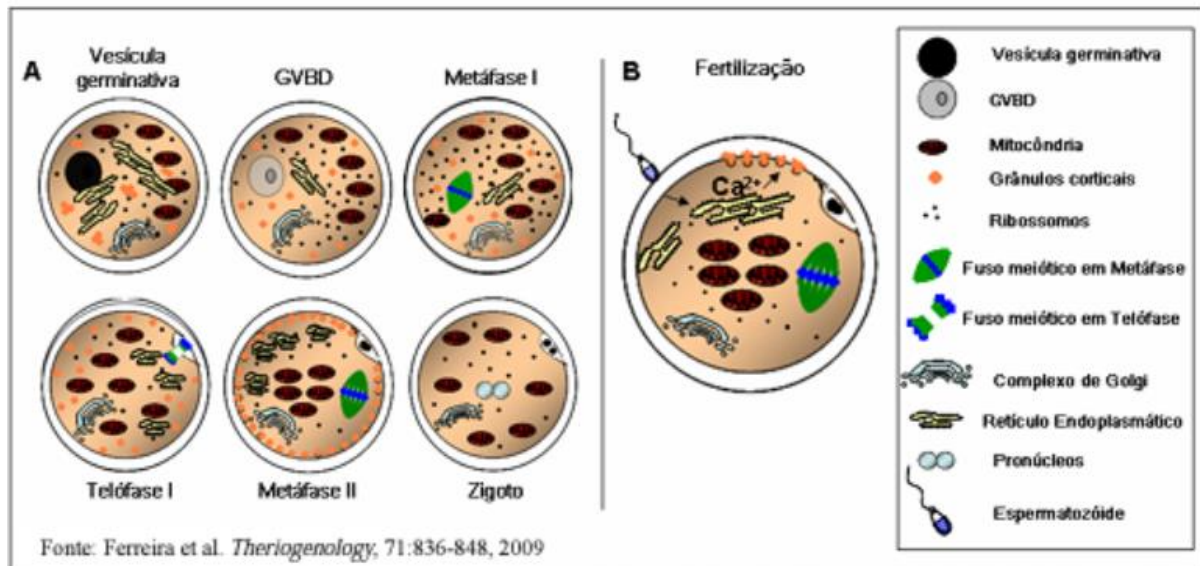


Figura 1. Esquema da distribuição das organelas citoplasmáticas durante a maturação, fertilização e formação do zigoto bovino. **A.** Progressão da maturação nuclear e movimentação das organelas citoplasmáticas, desde o estágio imaturo de vesícula germinativa até a maturidade plena, em metáfase II, e estágio de formação do zigoto; **B.** Distribuição das organelas e o mecanismo de liberação do conteúdo dos grânulos corticais, secundário à liberação do cálcio (Ca^{2+}) intracelular, engatilhado pela penetração do espermatozoide, na fertilização.

Para isso, é necessária uma incubadora que mantenha de forma exata a atmosfera gasosa e a temperatura. Os oócitos cultivados *in vitro* são afetados por diversas condições fisiológicas específicas, tais como a temperatura, o pH, a concentração de CO_2 e O_2 (GOTTARDI E MINGOTI, 2009).

No procedimento *in vitro*, os oócitos retornam à maturação meiótica espontaneamente após serem removidos artificialmente dos folículos ovarianos, devido à perda do ambiente natural de inibição meiótica. (GILCHRIST E THOMPSON, 2007; GOTTARDI E MINGOTI, 2009). Esse estado causa uma ruptura abrupta e prematura das junções gap dos complexos *cumulus*-oócito levando à perda de metabólitos benéficos (GILCHRIST E THOMPSON, 2007).

Além disso, verifica-se uma assincronia entre os processos de maturação nuclear e citoplasmática, que implica diretamente na redução das taxas de desenvolvimento embrionário (CROCOMO et al., 2011).

Taxas de blastocistos, prenhez e criopreservação obtidos a partir de oócitos maturados e fecundados *in vitro* são inferiores aos obtidos nos sistemas *in vivo*, provavelmente pela incompleta maturação citoplasmática, o que reflete na capacidade de obtenção de unidades embrionárias (GONÇALVES et al., 2008). A maturação oocitária inadequada, seja no núcleo ou no citoplasma, compromete o processo de fecundação e desenvolvimento embrionário (LONERGAN et al., 2003).

A avaliação dessa competência pode ser realizada indiretamente pela habilidade do oócito maduro em clivar-se até a obtenção de blastocisto (BI) após a ativação partenogenética (SCHWARZ, 2007). Outro parâmetro avaliativo indireto consiste na expansão das células do *cumulus*, o tempo de extrusão do 1º CP, aumento do espaço perivitelínico (KOTSUJI et al., 1994) e o uso de substâncias fluorescentes que permitem a visualização da configuração da cromatina dos oócitos.

2.3. FERTILIZAÇÃO IN VITRO

A fecundação se refere ao processo em que o espermatozoide entra em contato com o oócito, gerando o zigoto, que, posteriormente, se desenvolve até o estágio de blastocisto. Sabe-se que, no processo *in vivo*, os espermatozoides precisam chegar até a ampola da tuba uterina para fecundar o oócito, e que durante esse trajeto, substâncias presentes no sistema reprodutor da fêmea induzem a capacitação dos espermatozoides. Já no processo *in vitro*, para que ocorra todo esse processo, os meios e os protocolos usados devem fornecer um ambiente adequado, sendo que esse deve permitir o metabolismo dos oócitos e células do *cumulus*, além de manter a função espermática eficiente para que ocorra a fecundação (Yang et al., 1993, Assumpção et al., 2002, Gonçalves et al., 2007).

In vitro, o processo de capacitação espermática é desencadeado por glicosaminoglicanas (como a heparina), que são adicionadas nos meios de fecundação. Ao entrar em contato com o oócito, na presença de cálcio extracelular, o espermatozoide capacitado se liga a receptores presentes na zona pelúcida (ZP3) e sobre a reação acrossômica, determinada pela fusão das membranas plasmática e acrossomal. Assim, o conteúdo acrossômico é liberado, e somado à motilidade progressiva espermática, auxilia a penetração do espermatozoide e ligação aos receptores ZP2. Após penetrar o espaço perivitelino, a membrana plasmática do espermatozoide se funde à membrana vitelina, havendo liberação de cálcio no interior do oócito. Este influxo de cálcio promove a liberação do conteúdo dos grânulos corticais e reação zonal, que determina o enrijecimento da zona pelúcida e bloqueio à poliespermia (Varago et al., 2008).

O meio mais utilizado é FERT-TALP, possuindo em sua constituição fatores capazes de promover a capacitação espermática como é o caso da heparina, além de, outros fatores que são importantes para a motilidade e suporte do gameta masculino como a epinefrina, hipotaurina e penicilamina também estão presentes no meio (Iritani; Niwa, 1977). Os oócitos maturados *in vitro* podem ser fertilizados com sêmen fresco ou congelado/descongelado. Em

qualquer situação, é imprescindível a separação dos espermatozoides vivos dos mortos (Cognie et al., 2003). Os espermatozoides viáveis contidos em uma palheta de sêmen precisam ser separados do plasma seminal, crioprotetores, extensores e dos espermatozoides mortos antes de serem co-cultivados com os oócitos. Para bovinos, os métodos de separação espermática mais utilizados são o gradiente de PERCOLL e o swim-up. Após a separação, os espermatozoides são diluídos a uma concentração final de 1 a 5 x 10⁶ espermatozoides viáveis/ml de meio. O co-cultivo (espermatozoide e oócito) é realizado por um período de 18 a 22 horas, em temperatura de 39°C e atmosfera com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada (Gonçalves et al., 2007).

2.4. CULTIVO IN VITRO

O cultivo *in vitro* consiste na etapa de desenvolvimento do oócito fertilizado até o estágio de blastocisto (SANGILD et al., 2000).

É neste período de desenvolvimento que ocorrem eventos como ativação do genoma embrionário, processo de divisão celular, compactação dos blastômeros no estágio de mórula, início da diferenciação embrionária com a formação da blastocele (HOSHI, 2003).

As condições de cultivo *in vitro* influenciam nos índices da produção de embriões, razão pela qual inúmeras pesquisas têm sido realizadas visando avaliar o efeito que diferentes fatores, intrínsecos e extrínsecos, possam exercer sobre o metabolismo e capacidade de desenvolvimento destes embriões, como por exemplo a composição dos meios de cultivo e condições de temperatura e atmosfera gasosa, a adição de aminoácidos, vitaminas, macromoléculas e fatores de crescimento, assim como o uso de soros (NAGAI, 2001).

O desenvolvimento embrionário *in vitro* é avaliado no D7 (Dia 7) de cultivo analisando a compactação dos blastômeros e início da formação da blastocele, sendo feita a seleção e avaliação final dos embriões para a transferência a fresco ou para criopreservação.

2.5. DIAZINON

Os compostos organofosforados são substâncias químicas formadas por ésteres do ácido fosfórico ou por seus derivados e são, em sua maioria, um risco para saúde humana por ser muito tóxico. Essa classe química apresenta elevada lipossolubilidade, sendo absorvido pelo

organismo humano pela pele, especialmente pelas membranas mucosas, e pela via respiratória (ANVISA, 2012). A Figura 1 apresenta a fórmula geral destes inseticidas.

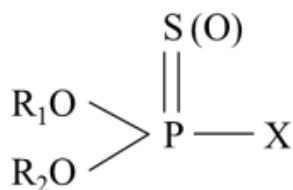
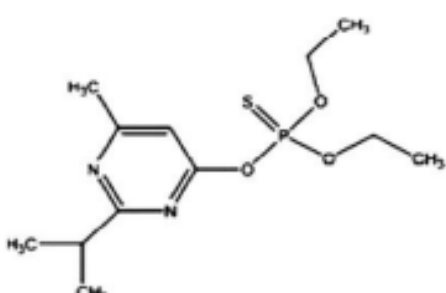


Figura 2: Estrutura geral dos organofosforados, adaptado de (ANVISA, 2012).

Segundo o EPA (Environmental Protection Agency), o diazinon foi o primeiro inseticida organofosforado sintético registrado nos Estados Unidos em 1956. Ele é utilizado na agricultura para o controle de insetos em vários tipos de cultivo, árvores de frutas, cana-de-açúcar, arroz, milho e tabaco. O mecanismo de ação dessa molécula consiste na inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), que ocasiona o bloqueio da hidrólise acetilcolina (ACh) levando à acumulação de neurotransmissores, ocasionando paralisia neuromuscular, convulsões e levando à morte do inseto (VELKI et al., 2017). O conhecimento das propriedades físico-químicas dos inseticidas é muito importante, pois através dele é possível prever o comportamento do mesmo no meio ambiente. Assim, a Tabela 1 apresenta algumas propriedades físico-químicas do diazinon.

Tabela 1: Propriedades físico-químicas de diazinon, adaptado de HORNSBY et al. (1996).

Características	
Fórmula molecular	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS
Estrutura Química	
Nomenclatura	O-O-dietil O- (2-isopropil-6-metil-4-pirimidinil)
Massa molecular	304,3 g.mol ⁻¹
Densidade	1,11 g cm ³ a 20 °C

Solubilidade em água	0.040 e 0.069 g.L-1 a (20-40 °C)
Pressão de vapor	1,40x10-4 – 8,4.10-5 mmHg a 20 °C
Coeficiente de partição/distribuição octanol-água (Kow)	2,5x104
Constante da Lei de Henry	1, 4.10-6 atm·m3 .mol-1
pKa	2,6 a 20 °C

O diazinon pode ser fabricado tanto em pó como em grânulos, líquido, microencapsulado e impregnado em materiais. É um dos inseticidas mais facilmente usados domesticamente e na agricultura (EPA, 2006). No entanto, a utilização de diazinon foi proibida para todo tipo de uso em residências no ano de 2004, pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, devido ao potencial de risco para a saúde humana, e na agricultura foi feito um acordo autorizando seu uso com restrições (BRAGA e BARROS, 2004). Ele é pouco miscível em água, mas é completamente solúvel em alguns solventes orgânicos como acetona, benzeno, etanol, tolueno e xileno (HORNSBY et al., 1996).

2.6. TROLOX

A vitamina E é um grupo de tocoferóis e tocotrienóis derivados de componentes presentes nos vegetais, sendo que apenas oito moléculas naturais revelam atividade antioxidante, quatro tocoferóis (α , β , γ , δ) e quatro tocotrienóis (α , β , γ , δ) (BRIGELIUS-FLOHÉ & TRABER, 1999; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

A vitamina E atua em lipídios e proteínas de baixa densidade presentes na membrana plasmática, conferindo proteção estrutural à membrana da ação dos oxidantes (KAGAN et al., 1992). Considerando a localização do α -tocoferol nas membranas subcelulares, acredita-se que ela remova principalmente o ânion superóxido, gerado por enzimas ligadoras de membrana que participam na oxidação biológica (NISHIKIMI e MACHLIN, 1975). Conhecida também como principal antioxidante lipofílico que protege os ácidos graxos polisaturados dos tecidos contra a peroxidação (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Diversos estudos com adição de vitamina E na alimentação de humanos e animais tem sido realizado com resultados positivos na melhora do índice reprodutivo. Devido aos efeitos benéficos da suplementação com esta vitamina, surge o interesse em adicionar tal composto ao

diluído na preservação de embriões, porém a natureza lipídica deste antioxidante dificultava sua dissolução em meios aquosos comumente utilizados. Assim foi desenvolvido o Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-788 croman-2-ácido carboxílico), análogo hidrossolúvel da Vitamina E, sintetizado por Scott e sua equipe em 1974 e indicado como antioxidante para a preservação de óleos e gorduras tanto animal quanto vegetal, apresentando sua ação antioxidante mais elevada que a do α e γ - tocoferol (SCOTT et al., 1974; CORT et al., 1975).

Sua estrutura é composta por um núcleo “croman”, semelhante ao do α -tocoferol, e um grupo ácido carboxílico no carbono 2 (figura3).

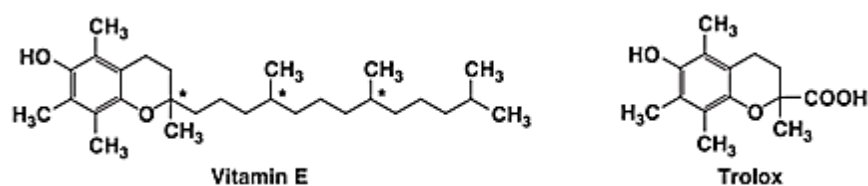


Figura 3: Estrutura molecular da Vitamina E e do Trolox. Fonte: Rezk et al., (2004)

Segundo Barclay et al., (1995) o Trolox apresenta vantagem em relação a outros antioxidantes que são apenas lipossolúveis, como α - tocoferol. Devido a sua estrutura cromanol que lhe dá atividade antioxidante e ao grupo carboxila, que tem moderado efeito hidrossolúvel, o Trolox é distribuído em ambas às fases da bicamada de lipídios das biomembranas, tornando-se um excelente protetor contra a lipoperoxidação. Apesar disso, o trolox pode ser adicionado diretamente à membrana lipídica (sistema intacto) sem a necessidade de solventes ou outros métodos de extração. Isto o torna conveniente para estudos em sistemas biológicos naturais.

REFERÊNCIAS

- ABD EL-AZIZ, M. I. SAHLAB, A. M. ABD EL-KHALIK, M. Influence of diazinon and deltamethrin on reproductive organs and fertility of male rats. *DTW. Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, v. 101, n. 6, p. 230-232, 1994.
- ADONA, P. R.; LEAL, C.L.V. Effect of concentration and exposure period to butirolactone I on meiosis progression in bovine oocytes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 3 p. 354-359, 2006.
- ANVISA, Agência nacional de vigilância sanitária. Consulta pública nº 8 de 19 de janeiro de 2012. Reavaliação toxicológica do ingrediente ativo da paration metílica, 2012.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE nº 2.475 de 08/06/12 (DOU de 11/06/12). Disponível em:< www.anvisa.gov.br/documents> Acessado em: nov. 2019.
- ASSUMPCÃO, M. E. O. D., HAIPECK, K., LIMA, A. L., MELLO, M. R. B., OLIVEIRA, V. P. TAVARES, L. M. T., VISINTIN, J. A. Capacitação espermática in vitro com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. **Braz J Vet Res Anim Sci**, v.39, p.149-156, 2002.
- BARCLAY, L.R.C.; ARTZ, J.D.; MOWAT, J.J. Partitioning and antioxidant action of the water-soluble antioxidant, Trolox, between the aqueous and lipid phases of phosphatidylcholine membranes: 14C tracer and product studies. **BiochimicaetBiophysicaActa**, v.1237, p. 77-85, 1995.
- BERNADI, M.L. Produção *in vitro* de Embriões Ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p1-16, 2005.
- BIANCHIN, I.; KOLLER, W. W.; ALVES, R. G. O.; DETMANN E. Effects of the horn fly, *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae) in the weight gain on Nellore cattle. *Ciência Rural*, v.34, n.3, p.885-890, 2004.
- BONILLA, E. HERNÁNDEZ, F. CORTÉS, L. MENDOZA, M. MEJÍA, J. Carrillo, E. CASAS, E. BETANCOURT, M. Effects of the insecticides malathion and diazinon on the early oogenesis in mice in vitro. *Environmental Toxicology: An International Journal*. 2008 Apr;23(2):240-5.
- BRAGA, R. M.; BARROS, A. T. M. Avaliação da susceptibilidade da mosca dos chifres, *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) a inseticida da classe dos organofosforados (diazinon) em Roraima. Comunicado Técnico 06, Boa Vista, 2004.
- BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; TRABER, M.G. Vitamin E: function and metabolism. **The FASEB Journal**, v.13, p. 1145-1155, 1999.
- BUENO, P.; A. BELTRAN, M. P. Produção in vitro de embriões bovinos. *Ver. Elet. Med. Vet.*, n.11, p.1-7, 2008.
- BYFORD, R. L.; CRAIG, M.; CROSBY, B. L. A review of ectoparasites and their effect on cattle production. *Journal of Animal Science*, v.70, p.597-602, 1992.

CAMPOS, C.P. SOUZA, G.D.P. TOLEDO, E.A. R.F.E. Métodos de controle químico da mosca-dos-chifres. *Rev. Cient. Elet. Med. Vet.*, 10 (2008), pp. 15-23

CASAS, E. BONILLA, E. DUCOLOMB, Y. BETANCOURT, M. Differential effects of herbicides atrazine and fenoxaprop-ethyl, and insecticides diazinon and malathion, on viability and maturation of porcine oocytes in vitro. *Toxicology in vitro*. 2010 Feb 1;24(1):224-30.

CHAVES, R.N. et al. Sistemas de cultivo in vitro para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, n.1, p.37-49, 2010.

CHILD, T. J.; ABDUL-JALIL, A. K.; GULEKI, B.; TAN, S. L. *In vitro* maturation and fertilization of oocytes from unstimulated normal ovaries, polycystic ovaries and women with polycystic ovary syndrome. **Fertil Steril**, v,76, p.936-942, 2001.

COGNIÉ, Y., BARIL, G., POULIN, N., MERMILLOD, P. **Estado atual das tecnologias de embriões em ovinos e caprinos**. *Theriogenology*, 59, pp. 171-188, 2003.

COGNIÉ, Y.; POULIN, N.; LOCATELLI, Y.; MERMILLOD, P. State of the production, conservation and transfer of in vitro produced embryos in small ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, p.437-445, 2004.

CORT, W.M.; SCOTT, J.W.; ARAUJO, M.; MERGENS, W.J.; CANNALONGA, M.A.; SCADA, M.; HARLEY, H. PARRISH, D.R.; POOL, W.R. 30 Antioxidant activity and stability of 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v.52, n.6, p.174-178, 1975.

CROCOMO, L.F. et al. Aspectos bioquímicos e ultraestruturas da maturação oocitária. **Veterinária e Zootecnia**, v.18, n.4, p. 542-552, 2011.

DE BEM, T. H. C.; ADONA, P. R.; BRESSAN, F. F.; MESQUITA, L. G.; CHIARATTI, M. R.; MEIRELLES, F. V.; LEAL, C. L. V. **The influence of morphology, follicle size and Bcl-2 and Bax transcripts on the developmental competence of bovine oocytes**. *Reproduction in Domestic Animals*, v.49, p.576-583, 2014.

DOMINGUES, Luísa N. et al. Characterization of *Haematobia irritans* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* control in Triângulo Mineiro and Alto Paranaíba, Minas Gerais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 32, n. 12, p. 1246-1252, 2012.

DUCCOLOMB, Y. CASAS, E. VALDEZ, A. GONZÁLEZ, G. ALTAMIRANO-LOZANO, M. BETANCOURT, M. In vitro effect of malathion and diazinon on oocytes fertilization and embryo development in porcine. *Cell biology and toxicology*. 2009 Dec 1;25(6):623.

EDWARDS, J. L.; HANSEN, P. J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. *Molecular Reproduction and Development*, v.46, p.138-145, 1997.

EPA - Environmental Protection Agency. Diazinon; EPA 738-R-04-006; U.S., Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Office of Pesticide Programs, U.S. Government Printing Office: Washington, 2006.

EVSTIGNEEVA, R. P.; VOLKOV, I. M.; CHUDINOVA, V. V. Vitamin E as a universal antioxidant and stabilizer of biological membranes. *Membrane & cell biology*, v. 12, n. 2, p. 151-172, 1998.

FOIL, L. D.; HOGSETTE J. A. Biology and control of tabanids, stable flies and horn flies. *Revue Scientifique et Technique de L'Office International des Epizooties*, v.13, p.1125-1158, 1994.

GARCIA, S.M.L.; FERNÁNDEZ, C.G. **Embriologia**. 3 ed. Porto alegre: Artmed, 2012.

GILCHRIST, R.B.; THOMPSON J. G. Oocyte maturation: Emerging concepts and Technologies to improve developmental potential in vitro. **Theriogenology**, v.67 p.6–15, 2007.

GOINDIN, Daniella et al. Levels of insecticide resistance to deltamethrin, malathion, and temephos, and associated mechanisms in *Aedes aegypti* mosquitoes from the Guadeloupe and Saint Martin islands (French West Indies). **Infectious diseases of poverty**, v. 6, n. 1, p. 38, 2017.

GONÇALVES, B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Varela, 2002. p. 195-226.

GONÇALVES P. B. D., BARRETA MB, SANDRI LR, FERREIRA R, ANTONIAZZI AQ. **Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte**. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.212-217, 2007.

GONÇALVES, P. B. D., OLIVEIRA, M. A. L., MEZZALIRA, A., MONTAGNER, M. M., VISITIN, J. A., COSTA, L. F. S. **Produção in vitro de embriões**. In: **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2.ed. São Paulo: Roca. p.261-291, 2008.

GONÇALVES, R. L. R.; VIANA, J. H. M. Situação atual da produção de embriões bovinos no Brasil e no mundo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.43, n.2, p.156-159, abr./jun. 2019.

GOTTARDI, F.P.; MINGOTI, G.Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.2, p.82-94, 2009.

GRISI, Laerte et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.

GUEMRA, S.; MONZANI, E. S.; SANTOS, R.; et al. 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**, v.65, n.6, p.1616-1624, 2013.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**.3ed., Oxford University Press: New York, 1999, 936p.

HARTWIG, F.P.; LISBOA, E.P.; HARTWIG, F.P.; MONTEIRO, G.A.; MAZIERO, R.R.; FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; DELL'AQUA JÚNIOR, J.A. Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: an alternative for bad cooler stallions. **Theriogenology**, v.81, p.340-346, 2014.

HORNSBY, A. G.; WAUCHOPE, R. D.; HERNER A. E. Pesticide Properties in the Environment, Springer-Verlag: New York, p. 83-84, 1996.

HOSHI, H. *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryo transfer. **Theriogenology**, v.59, p.675-685, 2003.

IETS, Embryo Technology Newsletter, v. 40, n.4, 2022

IRITANI A, NIWA K. **Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture.** J Reprod Ferti, v.50, p.119-121, 1977.

KAGAN, V.E.; SERBINOVA, E.A.; FORTE, T.; et al. Recycling of vitamin E in 1126 human low density lipoproteins. **Journal of Lipid Research**, v. 33, p. 385-397, 1992.

KOTSUJI, F.; KUBO, M.; TOMINAGA, T. Effect of interactions between granulosa and thecal cells on meiotic arrest in bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 100, p.151-6, 1994.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; FIRST, N. L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. **Journal of Animal Science**, v. 48, p.76-86, 1979.

LONERGAN, P. et al. Oocyte and Embryo Quality: Effect of Origin, Culture Conditions and Gene Expression Patterns. **Reproduction in Domestic Animals**, v.38, p.259–267, 2003.

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

MACHADO, C. I. I. U. F.; GUIMARÃES, A. C. G.; GONÇALVES, C. G. M. **Influência do sêmen de diferentes touros sobre as taxas de fecundação in vitro e desenvolvimento de embriões.** Anais In: Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, Universidade Federal do Pampa, v. 4, 2012.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Mapa. Instrução Normativa Mapa nº 51, de 04 de novembro de 2011, sobre a regulamentação e outras providências.

MELLO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; SOUSA, S.L. et al. Fatores ligados à doadora que influenciam na produção de embriões *in vitro* (PIVE). **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.40, n.2, p.51-57, abr./jun. 2016.

MOTA, L. H. C. M. **Efeito da melatonina sobre o desenvolvimento de embriões bovinos produzidos in vitro.** 2013. 52f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2013.

NAGAI, T. The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes. **Theriogenology**, v.55, p.1291-1301, 2001.

NISHIKIMI, M.; MACHLIN, L.J. Oxidation of α -tocopherol model compound by superoxide anion. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 170, p. 684-689, 1975.

- PAVLOK, A.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.31, p.63-67, 1992.
- PINA-GUZMAN, B.; SOLIS-HEREDIA, M. J.; QUINTANILLA-VEGA, B. Diazinon alters sperm chromatin structure in mice by phosphorylating nuclear protamines. *Toxicology and Applied pharmacology*, v. 202, n. 2, p. 189-198, 2005.
- RATH, D.; JOHNSON, L. A. Application and commercialization of flow cytometrically sexsorted semen. **Reprod Dom Anim**, v.43, p.338-346, 2008.
- SÁ, W. F.; VIZCARRA, V. E. L.; FERREIRA, A. M.; CAMARGO, L. S. A.; ARAUJO, M. C. C. Desenvolvimento pós-fecundação de oócitos bovinos pré-maturados em fluido folicular. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.55 n.3, 2003.
- SCHWARZ, K. L. **Atividade do system Oxído Nitríco sintase/oxído nítrico em oócitos bovinos**. 2007. 63f. Dissertação (Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007
- SCOTT, J.W.; CORT, W.M.; HARLEY, H.; PARRISH, D.R.; SAUCY, G. 6-Hydroxychroman-2-carboxylic acids: novel antioxidants. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v.51, p.200-203, 1974.
- SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**, v.49, p.483-497, 1998.
- SUTOVSKY, P. et al. Dynamic changes of gap junctions and cytoskeleton during in vitro of culture of cattle oocyte cumulus complexes. **Biology of Reproduction**, v.49, p.1277-1287, 1993.
- TIAN, X. et al. Beneficial effects of melatonin on bovine oocytes maturation: a mechanistic approach. **Journal of Pineal Research**, New York, v. 57, n. 3, p. 239–47, Oct. 2014.
- THOMAS, M.J. BIELSKI, B.H.J. Oxidation and reduction of Trolox c, a tocopherol analogue, in aqueous solution. A pulse – Radiolysis study. *Journal of Radiation Research*, 111 (1989), pp. 3315-3319
- VARAGO, F.C.; MENDONÇA, L.F.; LAGARES, M.A. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, Belo Horizonte, v. 36, p. 100-109, 2008.
- VECHIATO, T.A.F. et al. Avaliação do brinco mosquicida à base de Diazinon 40%* no controle da mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*) em bovinos criado em sistema extensivo. *A Hor. Vet.*, 191 (2013), pp. 32-35
- VELKI, M.; PAOLO, D. C.; NELLES, J.; SEILER, T-B.; HOLLERT, H. Diuron and Diazinon Alter the Behavior of Zebrafish Embryos and Larvae in the Absence of Acute Toxicity, *Chemosphere*, v. 180, p. 65–76, 2017.

VIANA, J. H. M.; FIGUEIREDO, A. C. S.; SIQUEIRA, L. G. B. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. **Animal Reproduction**, v.14, p.476-481, 2017.

VIANA, J. H. M. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: Is it a turning point? In 2017 more *in vitro*-produced than in vivo-derived embryos were transferred worldwide. **Embryo Transfer Newsl**, v.36(4), p.8-25, 2018.

WARZYCH, E.; PEIPPO, J.; SZYDLOWSKI, M. et al. Supplements to *in vitro* maturation media affect the production of bovine blastocysts and their apoptotic index but not the proportions of matured and apoptotic oocytes. **Anim. Reprod. Sci.**, v.97, p.334-343, 2007.

WATSON, A. J.; DE SOUSA, P.; CAVENEY, A. et al. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number and apoptosis. **Biol. Reprod.**, v.62, p.355-364, 2000.

YOKO, M.; SATO, E. Cumulus–oocyte complex interactions during oocyte maturation. **International Review of Cytology**, v. 91 p.235–251, 2004.

YANG, X., JIANG, S., FOOTE, R. H. Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures. **Mol Reprod Devel**, v.34, p.94-100, 1993.

CAPÍTULO I

EFEITO DO DIAZINON E TROLOX NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS (Effect of diazinon and trolox on in vitro production of bovine embryos)

Artigo elaborado conforme as normas do periódico Reproductive Toxicology (ISSN 1873-1708)

1 EFEITO DO DIAZINON E TROLOX NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES
2 BOVINOS

3
4 EFFECT OF DIAZINON AND TROLOX ON *IN VITRO* PRODUCTION OF BOVINE
5 EMBRYOS

6

7 Muriel Alves Carvalho ^a (siriuscarvalho@gmail.com)

8 Amilton Paulo Raposo Costa ^b (amilfox@uol.com.br)

9 José Adalmir Torres de Souza ^c (adalmir@ufpi.edu.br)

10 Anna Monallysa Silva de Oliveira ^d (amonallysa@gmail.com)

11 Misael das Virgens Santana ^a (misaelsantana2100@gmail.com)

12 Sérgio Henrique Costa Júnior ^e (sergiocosta94@outlook.com)

13 ^a Mastering Animal Science, UFPI, Teresina – PI, Brazil

14 ^b Veterinary Morphophysiology Department, UFPI, Teresina – PI, Brazil

15 ^c Department of Veterinary Clinic and Sugery, UFPI, Teresina – PI, Brazil

16 ^d Doctorate Animal Science, UFPI, Teresina – PI, Brazil

17 ^e Residency Program in the Professional area of health (Reproductin Animal), UFPI, Teresina
18 – PI, Brazil

19

20 RESUMO

21

22 Objetivou-se com este estudo avaliar se o diazinon, pode causar danos ao desenvolvimento
23 embrionário em bovinos e se o trolox é capaz de atenuar o comprometimento causado. Foi
24 utilizado o total de 1000 oócitos distribuídos entre dez tratamentos, cultivados em quatro
25 repetições, no qual cada grupo conteve 25 oócitos, cultivados com Diazinon em diferentes
26 concentrações e Trolox com uma única concentração, sendo elas G1)Controle; G2)Trolox 50
27 µM; G3)Diazinon 500 µM; G4)Diazinon 1000 µM; G5)Diazinon 2000 µM; G6)Diazinon 4000
28 µM; G7)Diazinon 500 + Trolox 50 µM; G8)Diazinon 1000 + Trolox 50 µM; G9)Diazinon 2000
29 + Trolox 50 µM; G10)Diazinon 4000 + Trolox 50 µM. A avaliação da taxa de clivagem foi
30 realizada após 48 horas do início do cultivo e a formação de blastocisto após 168 horas. Foi
31 realizado análise de variância e posteriormente teste de Duncan, ao nível de 5% de
32 probabilidade. Os dados foram avaliados pelo programa SigmaStat versão 3.5. Para avaliação
33 de taxa de clivagem as concentrações testadas de Diazinon e Trolox não apresentaram resultado
34 significativo quando comparadas ao grupo controle. Para a avaliação de blastocisto houve

35 diferenças significativas entre os grupos para blastocisto inicial, blastocisto e total de blastocistos
36 (TBL). Para avaliação dos graus de qualidade dos embriões, houve diferença significativa apenas
37 para os de grau 2. Conclui-se com os resultados deste estudo que o Diazinon é potencialmente
38 tóxico para o embrião bovino e o Trolox não demonstrou ser atenuador da toxicidade do
39 pesticida.

40

41 **Palavras-chave:** Organofosforado; antioxidante; toxicidade embrionária

42

43 1. INTRODUÇÃO

44

45 Os pesticidas organofosforados são amplamente utilizados na agricultura moderna para
46 controle de pragas vegetais ou frutas. Eles também são usados na pecuária para controle de
47 ectoparasitas, especialmente a *Haematobia irritans* (mosca-dos-chifres). A *Haematobia*
48 *irritans*, é um ectoparasito comum nos rebanhos bovinos de todo o país. O incômodo diário
49 causado aos bovinos pelas frequentes picadas leva a significativas perdas da produção
50 (Bianchin et al., 2004; Byford et al., 1992; Foil; Hogsette, 1994).

51

52 De acordo com Domingues et al. (2012), dentre todas as vias de administração de
53 ectoparasiticidas utilizados em bovinos naturalmente infestados por moscas, destaca-se a
54 pulverização de corpo inteiro. No entanto, atualmente essa via vem sendo substituída pelo uso
55 de brincos impregnados com inseticida, que são colocados na orelha dos bovinos, permitindo
56 que o medicamento seja distribuído por difusão entre as partículas de gordura presentes na pele
57 do animal (Vechiato et al., 2013).

58

59 O diazinon (O,O-diethyl O-2-isopropyl-6-methylpyrimidin-4-yl phosphorothioate) é um
60 inseticida organofosforado (OP), largamente utilizado para controle de ectoparasitos no gado
61 de corte. É aprovado para uso agropecuário no Brasil (MAPA, 2011), classificação toxicológica
62 na classe II, sua utilização no ambiente domissanitário não é autorizado e ingestão diária
63 aceitável é de 0,002 mg/kg p.c. (Anvisa, 2019).

64

65 Estudos demonstram que este pesticida afeta os órgãos reprodutivos em ratos, diminuindo o
66 peso genital, reduzindo a mobilidade, viabilidade e aumenta as anormalidades morfológicas dos
67 espermatozoides (Abd el-Aziz et al., 1994). Além disso, altera a estrutura da cromatina dos
68 espermatozoides em ratos (Piña-Guzman et al., 2005). Em fêmeas, foi demonstrado que o
69 diazinon prejudica o desenvolvimento de oócitos de camundongos (Bonilla et al., 2008) e
70 suínos, o que compromete a viabilidade, maturação (Casas et al., 2010), fertilização in vitro e
71 desenvolvimento de embriões (Ducolomb et al., 2009).

72

73 O trolox é um análogo da vitamina E solúvel em água, no qual a cauda poli-isoprenóide foi
74 substituída por uma porção carboxila (Thomas & Bielski., 1989). A vitamina E é considerada
75 um importante antioxidante natural com base em suas propriedades, como
76 a inibição da peroxidação lipídica , que é uma contribuição para a defesa antioxidante
77 nas membranas biológicas, sendo a primeira linha de defesa contra a peroxidação de ácidos
78 graxos poliinsaturados (Evstigneeva et al., 1998).

79

80 Nos embriões bovinos, não existem estudos sobre o efeito do diazinon e seus possíveis
81 comprometimentos. Com isso objetivou-se com este estudo avaliar se o diazinon, pode causar
82 danos ao desenvolvimento embrionário em bovinos e se o trolox é capaz de atenuar o
83 comprometimento causado.

84

85 2. MATERIAL E MÉTODOS

86

87 2.1.Ética em Experimentação Animal

88

89 Todos os procedimentos realizados estavam em conformidade com a legislação brasileira em
90 pesquisa animal (Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008). O procedimento descrito neste artigo
91 foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do
92 Piauí (UFPI) sob o protocolo de Nº 670/21.

93

94 2.2. Local do Experimento, Rastreamento e Seleção dos Complexos

95

96 O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal
97 CCA/UFPI, Campos Socopo, Teresina-PI, durante o período de junho a outubro de 2021. Os
98 ovários foram obtidos de fêmeas bovinas abatidas pela Marchantaria Santa Rita e transportados
99 até o laboratório em recipiente térmico com DMPBS – FLUSH (Nutricell®) a uma temperatura
100 de 35°C, sendo que o tempo entre a obtenção dos ovários e a manipulação no laboratório não
101 excedeu 2 horas.

102

103 No laboratório, os ovários foram lavados com DMPBS – FLUSH (Nutricell®) a 37°C e os
104 Complexos Cumulus-Oócitos (CCOs) recuperados por aspiração dos folículos antrais,
105 utilizando agulhas descartáveis 25 x 8mm (21G), acoplado a uma seringa de 3mL. O líquido
106 folicular obtido foi colocado em um tubo do tipo Falcon de 15mL e armazenado em Banho-
107 Maria a 37°C.

108

109 Após a aspiração, o líquido folicular passou pelo processo de decantação durante 15 minutos
110 para obtenção do *pellet*. O conteúdo decantado foi transferido, com auxílio de pipeta de Pasteur,
111 para placa de Petri de 90 x 20mm para pesquisa e seleção diluído em DMPBS – FLUSH
112 (Nutricell®) aquecido sob uma lupa estereomicroscópio (NOVA Optical Systems).

113

114 Os CCOs foram classificados de acordo com a qualidade morfológica conforme
115 LEIBFRIED-RUTLEDGE e FIRST, 1979:

116

117 Grau I: *cumulus* compacto presente, contendo mais de três camadas de células, ooplasma com
118 granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de
119 coloração marrom;

120

121 Grau II: *cumulus* compacto parcialmente presente em volta do oócito ou rodeando-o por
122 completo, com menos de três camadas celulares, ooplasma com granulações distribuídas de
123 modo heterogêneo, podendo estar mais concentradas no centro e mais claras na periferia, ou
124 condensadas em um só local aparentando uma mancha escura, ooplasma preenche o espaço do
125 interior da zona pelúcida;

126

127 Grau III: *cumulus* presente, mas expandido, ooplasma contraído, degenerado, vacuolado, ou
128 fragmentado, com espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida, preenchendo
129 irregularmente o espaço perivitelino;

130

131 Grau IV: oócito desnudo sem *cumulus*.

132

133 Entretanto, somente os CCOs de grau I e II foram selecionados como viáveis e
134 transferidos para uma placa de Petri 60x20mm contendo 100µL de meio manutenção Holding
135 Plus 0,4% BSA (VITROCELL, BR).

136

137 2.3. Grupos Experimentais

138

139 Para avaliar o efeito da adição do diazinon (Sigma-Aldrich), da adição de trolox (Sigma-
140 Aldrich) e da adição de ambos nos meios de maturação, fertilização e cultivo. As concentrações
141 de inseticida e antioxidante usadas foram baseadas em um estudo anterior sobre seu efeito em
142 COCs suínos in vitro (Flores et al. 2017). Foi utilizado o total de 1000 oócitos distribuídos entre
143 dez tratamentos, cultivados em quatro repetições, no qual cada grupo conteve 25 oócitos, para
144 avaliar o efeito individual das substâncias e da associação das mesmas dos grupos
145 experimentais abaixo especificados:

146

147 Controle (C): MIV + FIV + CIV

148 Trolox 50µM (T50): MIV + FIV + CIV

149 Diazinon 500µM (D500): MIV + FIV + CIV

150 Diazinon 1000µM (D1000): MIV + FIV + CIV

151 Diazinon 2000µM (D2000): MIV + FIV + CIV

152 Diazinon 4000µM (D4000): MIV + FIV + CIV

153 Diazinon 500µM + Trolox 50µM (D500T50): MIV + FIV + CIV

154 Diazinon 1000µM+ Trolox 50µM: (D1000T50): MIV + FIV + CIV

155 Diazinon 2000µM+ Trolox 50µM (D2000T50): MIV + FIV + CIV

156 Diazinon 4000µM+ Trolox 50µM (D4000T50): MIV + FIV + CIV

157

158 2.4. Experimento

159

160 Os CCOs selecionados, passaram por três banhos em meio de maturação, em placa de Petri 90
161 x 20mm e maturados de acordo com os tratamentos em microgotas de 100µL de meio de
162 maturação (GeneUp Biotecnologia), composto por TCM 199 e 10% de SFB (Soro Fetal
163 Bovino), sob óleo mineral, em placas de Petri 90 x 20mm, incubados à 38,5°C com atmosfera
164 de 5% de CO₂ em ar, por um período de 24 horas.

165

166 Após a maturação, os CCOs passaram por três banhos em meio de fertilização, em placa de
167 Petri de 90x20mm e fecundados de acordo com o tratamento em microgotas de 100µL de meio
168 de fertilização (GeneUp Biotecnologia), constituído de PHE (penicilina, hipotaurina e
169 epinefrina), heparina e BSA (Albumina Sérica Bovina), por período de 22h, em temperatura de
170 38,5°C com atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

171

172 Para a realização da fertilização *in vitro*, uma dose de sêmen foi descongelada a 37°C por 30
173 segundos e centrifugada em gradiente de Percoll (45% e 90%; GeneUp Biotecnologia) a
174 8000rpm, durante 7 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido, os
175 espermatozoides ressuspensos em 1mL de meio de fertilização e centrifugados a 3200rpm
176 por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, e 5µL do pellet (60 µL) diluído em 250µL de
177 solução formol salina, para realização da contagem espermática em câmara de Neubauer, bem
178 como 5µL do pellet colocado entre lâmina e lamínula para avaliação de motilidade e o vigor.
179 Posteriormente, cada tratamento foi co-incubado com espermatozoides, à concentração final de
180 1×10^6 espermatozoides/ML.

181

182 Seguida a fertilização *in vitro*, os presumíveis zigotos foram isolados das células do cumulus
183 mediante sucessivas aspirações e passaram por três banhos em meio SOF (Gene Up
184 Biotecnologia®). Posteriormente, os mesmos foram transferidos para uma placa de Petri 60 x
185 20 mm, contendo microgotas de 100µL de meio SOF (Gene Up Biotecnologia®) composto por
186 SOF, EGF (Fator de Crescimento Epidermal), BSA e SFB, e mantidos em estufa à temperatura
187 de 38,5°C, em 5% de CO₂, durante 7 dias.

188

189 No terceiro e quinto dia de cultivo foi realizado o “*feeding*”, que é a troca de 60% do meio SOF
190 por um novo meio previamente estabilizado. A avaliação da taxa de clivagem foi realizada após
191 48 horas o início do cultivo e a formação de blastocisto após 168 horas após.

192

193 2.5. Análise e Estatística

194

195 Foi realizado análise de variância e posteriormente teste de Duncan, ao nível de 5% de
196 probabilidade, os resultados foram expressos como média e erro padrão da média. Os dados
197 foram avaliados pelo programa Sigma Stat versão 3.5.

198

199 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

200 Os dados apresentados referentes à adição de diazinon, trolox e associação de ambos, realizada
201 durante o experimento, mostraram que a adição não influenciou significativamente ($P>0,05$)
202 nas taxas de clivagem avaliadas no terceiro dia de cultivo (D3), quando comparadas com as
203 taxas de clivagem apresentadas pelo grupo Controle (tab 1). Esses dados estão de acordo com
204 os resultados obtidos por Ducolomb et al, (2009) em embriões suínos, onde o diazinon não
205 afetou o desenvolvimento embrionário em estágios iniciais.

206

207 **Tabela 1:** Média \pm EPM da taxa de clivagem (D3) de embriões bovinos em meios de maturação,
208 fertilização e cultivo acrescidos de diferentes doses de Diazinon, com ou sem associação com
209 Trolox.

Grupos	Taxa de Clivagem
Controle	11\pm0,981
Trolox 50 μM	9,5\pm0,98
Diazinon 500 μM	12\pm0,981
Diazinon 1000 μM	10,5\pm0,981
Diazinon 2000 μM	9\pm0,981
Diazinon 4000 μM	12\pm0,981
Diazinon 500 + Trolox 50 μM	12,5\pm0,981
Diazinon 1000 + Trolox 50 μM	10,5\pm0,981
Diazinon 2000 + Trolox 50 μM	13\pm0,981
Diazinon 4000 + Trolox 50 μM	8\pm0,981

210 Taxas de clivagem no D3 avaliado pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade. Não foi observado diferença
211 estatisticamente significativa entre os tratamentos.

212

213 Os dados apresentados referentes à adição de diazinon, com ou sem a adição de trolox aos meios
214 de maturação, fertilização e cultivo *in vitro*, realizada durante o experimento, mostraram que,
215 na maioria dos grupos, a adição diazinon influenciou negativamente ($P>0,05$) nas taxas de
216 blastocistos iniciais, blastocistos e total de blastocistos (TBL) avaliadas no sétimo dia de cultivo
217 (D7) (tab 2).

218

219 **Tabela 2:** Média \pm EPM da taxa de estruturas e blastocisto total (TBL) encontradas no D7 do cultivo *in vitro* em meios acrescidos de diferentes
 220 doses de Diazinon, Trolox ou associação de ambos.

	Controle	T50 μ M	D500 μ M	D1000 μ M	D2000 μ M	D4000 μ M	D500T50 μ M	D1000T50 μ M	D2000T50 μ M	D4000T50 μ M
Blastocisto Inicial	4,5 \pm 0,774 ^a	3 \pm 0,774 ^{ab}	0,75 \pm 0,774 ^{bc}	0,75 \pm 0,774 ^{bc}	0 \pm 0 ^c	1,25 \pm 0,774 ^{bc}	0,25 \pm 0,774 ^c	1,25 \pm 0,774 ^{bc}	0 \pm 0 ^c	1 \pm 0,774 ^{bc}
Blastocisto	3 \pm 0,922 ^{abc}	2,5 \pm 0,922 ^{bc}	1,5 \pm 0,922 ^{bc}	1,75 \pm 0,922 ^{bc}	1,75 \pm 0,922 ^{bc}	3,5 \pm 0,922 ^{ab}	4 \pm 0,922 ^{ab}	0,5 \pm 0,922 ^c	5,5 \pm 0,922 ^a	0 \pm 0 ^c
Blastocisto Expandido	0,75 \pm 0,247	0 \pm 0	0,75 \pm 0,247	0,5 \pm 0,247	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0,25 \pm 0,247	0 \pm 0
TBL (%)	8,25 \pm 1,228 ^a (33%)	5,50 \pm 1,228 ^{ab} (22%)	3 \pm 1,228 ^{bc} (12%)	3 \pm 1,228 ^{bc} (12%)	1,75 \pm 1,228 ^{bc} (7%)	4,75 \pm 1,228 ^{abc} (19%)	4,25 \pm 1,228 ^{bc} (17%)	1,75 \pm 1,228 ^{bc} (7%)	5,75 \pm 1,228 ^{ab} (23%)	1 \pm 1,228 ^c (4%)

221 ^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa a 5% de probabilidade, $p < 0,05$. Taxas de blastocisto inicial,
 222 blastocistos, blastocisto expandido e total de blastocisto no D7 avaliado pelo teste de Duncan.

223 A tabela 3 apresenta os resultados da avaliação das taxas de blastocisto eclodido, identificados
 224 no sétimo de dia de cultivo, uma vez que este achado só deveria ser encontrado no nono dia do
 225 cultivo. No qual a adição de diazinon, trolox e ambos aos meios de produção *in vitro* de
 226 embriões bovinos, não interferiu significativamente ($P>0,05$). No entanto, por esse achado ter
 227 ocorrido apenas nos grupos que foram adicionados diazinon, pode-se suspeitar do efeito do
 228 diazinon, acelerando o desenvolvimento dos embriões.

229

230 **Tabela 3.** Taxa de blastocistos eclodidos observados no sétimo dia de cultivo do cultivo *in vitro*
 231 (D7) em meio acrescido de diferentes doses de Diazinon, com ou sem associação com Trolox.

Grupo experimental	Total de Blastocisto Eclodido
Controle	0
Trolox 50 μM	0
Diazinon 500 μM	1
Diazinon 1000 μM	0
Diazinon 2000 μM	2
Diazinon 4000 μM	1
Diazinon 500+Trolox 50 μM	0
Diazinon 1000+Trolox 50 μM	1
Diazinon 2000+Trolox 50 μM	0
Diazinon 4000+Trolox 50 μM	0

232 Taxas de blastocistos eclodido avaliado pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade. Não foi
 233 observado diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos.

234

235 Quanto a avaliação da qualidade dos embriões (tab. 4) os resultados demonstram que houve
 236 diferença significativa entre os tratamentos, apenas entre os embriões Grau 2, onde houve
 237 redução do número de embriões dessa categoria 2 em todos os grupos tratados com diazinon,

238 com ou sem a adição do trolox. Observa-se então que o trolox não foi capaz de reduzir o efeito
 239 deletério do diazinon.

240

241 **Tabela 4.** Média \pm EPM do número de embriões bovinos cultivados em meios acrescidos de
 242 diferentes concentrações de diazinon, com ou sem associação com trolox, de acordo com a
 243 classificação da qualidade.

Grupo Experimental	Grau 1	Grau 2	Grau 3
Controle	3,75\pm0,901	4,5\pm0,772^a	0\pm0
Trolox 50 μM	3,75\pm0,901	1,5\pm0,772^b	0,25\pm0,316
Diazinon 500 μM	1,25\pm0,901	1,5\pm0,772^b	0,25\pm0,316
Diazinon 1000 μM	0,75\pm0,901	1,5\pm0,772^b	0,75\pm0,316
Diazinon 2000 μM	0,25\pm0,901	1\pm0,772^b	0,5\pm0,316
Diazinon 4000 μM	1,75\pm0,901	2\pm0,772^b	1\pm0,316
Diazinon 500+Trolox 50 μM	2\pm0,901	1,75\pm0,772^b	0,5\pm0,316
Diazinon 1000+Trolox 50 μM	1,25\pm0,901	0,25\pm0,772^b	0,25\pm0,316
Diazinon 2000+Trolox 50 μM	2,5\pm0,901	2,5\pm0,772^{ab}	0,75\pm0,316
Diazinon 4000+Trolox 50 μM	0,25\pm0,901	0,5\pm0,772^b	0,25\pm0,316

244 ^{a,b.} Letras minúsculas diferentes na mesma coluna mostram diferença estatisticamente
 245 significativa a 5% de probabilidade ($p < 0,05$) pelo teste de Duncan.

246

247 Os organofosforados (OP) como diazinon, inibem a atividade da acetilcolinesterase (AChE)
 248 através da união irreversível com o sítio catalítico da enzima. Esta enzima está relacionada com
 249 a modulação da transmissão do impulso neuromuscular. Além disso, pode estar relacionado a
 250 outros processos não neuromusculares como interações celulares mediadas por eventos

251 elétricos e mudanças nas concentrações de íons, que ocorrem durante a interação dos gametas
252 e o desenvolvimento embrionário (Aluigi et al 2005; Ducolomb et al 2009).

253

254 No trabalho de Durak et al (2008), o OP malathion demonstrou produzir estresse oxidativo
255 através da geração de radicais livres e alteração do sistema de defesa antioxidante celular. Os
256 lipídios são outras biomoléculas altamente suscetíveis a serem danificadas por espécies reativas
257 a oxigênio (EROs), e sua peroxidação tem sido sugerida como um dos mecanismos envolvidos
258 na toxicidade induzida por pesticidas via dano aos fosfolipídios da membrana que diminui a
259 fluidez da membrana. Induzindo assim alterações estruturais severas, reduzindo a atividade
260 enzimática ligada à membrana, afetando assim as vias de sinalização celular (Khrer 1993). O
261 diazinon pode ter causado lesões aos embriões por estes mecanismos.

262

263 Trolox é um candidato promissor para atenuar o dano causado por ERO porque, como análogo
264 da vitamina E, pode reduzir a oxidação nos lipídios da membrana celular e tem demonstrado
265 proteger as células de mamíferos do dano oxidativo tanto in vivo quanto in vitro (Saikhun et al
266 2008). A vitamina E é o antioxidante mais importante presente nos ovários e no fluido folicular,
267 e sua deficiência afeta a sobrevivência do embrião (Wongsrikeao et al 2007). No entanto, uma
268 vez que neste estudo o trolox não foi capaz de reduzir os efeitos do diazinon, não pode ser
269 atribuído o efeito deletério observado para os embriões à atividade pró-oxidante do
270 organofosforado. Assim, deve ser investigado outro mecanismo envolvido nesse efeito
271 deletério. Foi relatado que o diazinon causou depleção nas proteínas totais e carboidratos nos
272 tecidos pulmonar e intestinal de cobaias, de modo proporcional à dose (Rady, M.I, 2009), o que
273 pode ser um indício de mecanismo que pode também ocorrer com os embriões, tendo-se em
274 vista que as proteínas são essenciais à multiplicação celular essencial ao desenvolvimento
275 embrionário.

276

277 Assim, tornam-se necessários estudos visando verificar se esse efeito verificado in vitro pode
278 prejudicar a reprodução in vivo, levando a redução dos índices de prenhez, devido a perdas
279 embrionárias que podem ocorrer nos rebanhos em reprodução natural ou assistida.

280

281 Esses resultados apontam para a necessidade do desenvolvimento de métodos alternativos de
282 controle de pragas mais compatíveis com o homem e o meio ambiente. Esta é uma abordagem
283 para futuras investigações no modelo *in vivo* para efeitos produzidos por esse pesticida
284 amplamente usado.

285

286 4. CONCLUSÃO

287

288 Conclui-se com base nesses resultados que o diazinon tem efeito tóxico para os embriões
289 bovinos cultivados *in vitro* e que o trolox não apresentou uma ação atenuadora dessa toxicidade
290 na dose testada, podendo tal efeito ter sido ocasionado por mecanismo não oxidativo.

291

AGRADECIMENTOS

292

UFPI - Universidade Federal do Piauí

293

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

294

295 5. REFERENCIAS

296

297 ABD EL-AZIZ, M. I. SAHLAB, A. M. ABD EL-KHALIK, M. Influence of diazinon and
298 deltamethrin on reproductive organs and fertility of male rats. **DTW. Deutsche tierärztliche**
299 **Wochenschrift**, v. 101, n. 6, p. 230-232, 1994.

300

301 ALUIGI M. G. , ANGELINI C. , FALUGI C. , et al. Interação entre compostos
302 organofosforados e funções colinérgicas durante o desenvolvimento . **Chem Biol Interact.**
303 2005 ; 157 : 305 – 316 .

304

305 **ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA.** Resolução RE nº
306 2.475 de 08/06/12 (DOU de 11/06/12). Disponível em:< www.anvisa.gov.br/documents>
307 Acessado em: nov. 2019.

308

309 BIANCHIN, I.; KOLLER, W. W.; ALVES, R. G. O.; DETMANN E. Effects of the horn fly,
310 *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae) in the weight gain on Nellore cattle. **Ciência**
311 **Rural**, v.34, n.3, p.885-890, 2004.

312

313 BONILLA, E. HERNÁNDEZ, F. CORTÉS, L. MENDOZA, M. MEJÍA, J. Carrillo, E. CASAS,
314 E. BETANCOURT, M. Effects of the insecticides malathion and diazinon on the early
315 oogenesis in mice in vitro. **Environmental Toxicology: An International Journal**. 2008
316 Apr;23(2):240-5.

317

318 BYFORD, R. L.; CRAIG, M.; CROSBY, B. L. A review of ectoparasites and their effect on
319 cattle production. **Journal of Animal Science**, v.70, p.597-602, 1992.

320

321 CASAS, E. BONILLA, E. DUCOLOMB, Y. BETANCOURT, M. Differential effects of
322 herbicides atrazine and fenoxaprop-ethyl, and insecticides diazinon and malathion, on viability
323 and maturation of porcine oocytes in vitro. **Toxicology in vitro**. 2010 Feb 1;24(1):224-30.

324

325 DOMINGUES, Luísa N. et al. Characterization of Haematobia irritans and Rhipicephalus
326 (Boophilus) microplus control in Triângulo Mineiro and Alto Paranaíba, Minas
327 Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 12, p. 1246-1252, 2012.

328

329 DUCOLOMB, Y. CASAS, E. VALDEZ, A. GONZÁLEZ, G. ALTAMIRANO-LOZANO, M.
330 BETANCOURT, M. In vitro effect of malathion and diazinon on oocytes fertilization and
331 embryo development in porcine. **Cell biology and toxicology**. 2009 Dec 1;25(6):623.

332

333 DURAK D, UZUN F, KALENDER S, OGUTCU A, UZUNHISARCIKLI M, KALENDER F.
334 Estresse oxidativo induzido por malatião em eritrócitos humanos e o efeito protetor das
335 vitaminas C e E in vitro . **Ambiente Toxicol**. 2008 ; 24 : 235 – 242 .

336

337 EVSTIGNEEVA, R. P.; VOLKOV, I. M.; CHUDINOVA, V. V. Vitamin E as a universal
338 antioxidant and stabilizer of biological membranes. **Membrane & cell biology**, v. 12, n. 2, p.
339 151-172, 1998.

340

341 FLORES, D V. SOUZA, M. BETANCOURT, M. TETELTITLA, H. GONZALEZ,
342 MARQUEZ, E. CASAS, E. BONILLA, P. RAMIREZ-NOGUERA, M.C. GUTIERREZ-
343 RUIZ, Y. **Oxidative stress as a damage mechanism in porcine cumulus-oocyte complexes**
344 **exposed to malathion during in vitro maturation Environ. Toxicol.**, 32 (2017), pp. 1669-
345 1678.

346

347 FOIL, L. D.; HOGSETTE J. A. Biology and control of tabanids, stable flies and horn flies.
348 **Revue Scientifique et Technique de L`Office International des Epizooties**, v.13, p.1125-
349 1158, 1994.
350
351 KHRER JP. Radicais livres como mediadores de lesão tecidual e doença . **Crit Rev Toxicol**.
352 1993 ; 23 : 21 - 48 .
353
354 **MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Mapa.** Instrução Normativa
355 Mapa nº 51, de 04 de novembro de 2011, sobre a regulamentação e outras providências.
356
357 PINA-GUZMAN, B.; SOLIS-HEREDIA, M. J.; QUINTANILLA-VEGA, B. Diazinon alters
358 sperm chromatin structure in mice by phosphorylating nuclear protamines. **Toxicology and**
359 **Applied pharmacology**, v. 202, n. 2, p. 189-198, 2005.
360
361 SAIKHUN K , FAISAIKARM T , MING Z , LU KH , KITIYANANT Y. α -tocoferol e ácido
362 L-ascórbico aumentam o desenvolvimento in vitro de embriões de búfalos de pântano (*Bubalus*
363 *bubalis*) in vitro . **Animais** 2008; 2: 1486-1490.
364
365 THOMAS, M.J. BIELSKI, B.H.J. Oxidation and reduction of Trolox c, a tocopherol analogue,
366 in aqueous solution. **A pulse – Radiolysis study. Journal of Radiation Research**, 111 (1989),
367 pp. 3315-3319.
368
369 VECHIATO, T.A.F. et al. Avaliação do brinco mosquicida à base de Diazinon 40%* no
370 controle da mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*) em bovinos criado em sistema extensivo.
371 **A Hor. Vet.**, 191 (2013), pp. 32-35.
372
373 WONGSRIKEAO P, AUGUNG B, TANIGUCHI M, KUNISHI M, SOTO S, OTOI T.
374 Melhoria da eficiência de doação de transgênicos cultivando oócitos receptores e células
375 doadoras com vitaminas antioxidantes em bovinos . **Mol Reprod Dev**. 2007; 74: 694



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil, CEP: 64049-550
Telefone: (86) 3215-5734, e-mail: ceaa@ufpi.edu.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Efeito de indutores de estresse subletal sobre a produção in vitro de embriões bovinos**", registrada nº **670/21**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. AMILTON PAULO RAPOSO COSTA** do Departamento de Morfofisiologia Veterinária/CCA/UFPI que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **12/04/2021**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	05/06/2021 a 15/10/2025
Espécie/Linhagem/raça	Bovino/ Zebuino
Nº de Animais	12
Peso/ Idade	450kg/ 18 a 30 meses
Sexo	Fêmeas
Origem	Abatedouro- Marchantaria Santa Rita, Estrada da Alegria, CP: 64039-991, Teresina-PI-Brasil.
Local de alojamento dos animais durante o experimento	Fazendas -Várias regiões do Piauí e Maranhão.
Grau de Invasividade	1

Teresina, 27 de Abril de 2021.


Prof^ª. Ivete L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora