



Universidade Federal do Pará
Universidade Federal Rural da Amazônia
Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal na Amazônia.

PATRICIA DE CÁSSIA DA SILVA LIMA

**UTILIZAÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO MEIO DE
FECUNDAÇÃO *IN VITRO* DE ÓOCITOS BOVINOS**

Orientadora: Profa. Dra. Nathália Nogueira da Costa Almeida

Coorientadora: Profa. Dra. Marcela Cordeiro

Belém-PA

Outubro-2025



Universidade Federal do Pará
Universidade Federal Rural da Amazônia
Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal na Amazônia

PATRICIA DE CÁSSIA DA SILVA LIMA

UTILIZAÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO MEIO DE FECUNDAÇÃO *IN VITRO* DE ÓOCITOS BOVINOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal na Amazônia, da Universidade Federal do Pará, Universidade Federal Rural da Amazônia.

Orientadora: Profa. Dra. Nathália Nogueira da Costa Almeida

Coorientadora: Profa. Dra. Marcela Cordeiro

Belém-PA

Outubro-2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Bibliotecas da Universidade Federal Rural da Amazônia
Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- D111u da Silva Lima, Patrícia de Cássia
Utilização de Plasma Rico em Plaquetas no Meio de Fecundação in vitro de óocitos Bovinos / Patrícia de Cássia da Silva Lima. - 2026.
059 f. : il. color.
- Dissertação (Mestrado) - Programa de PÓS-GRADUAÇÃO em Reprodução Animal na AMAZÔNIA (ReproAmazon), Campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural Da Amazônia, Belém, 2026.
Orientador: Prof. Dr. Nathália Nogueira da Costa Almeida
Coorientador: Prof. Dr. Marcela da Silva Cordeiro.
1. Fecundação. 2. Estresse Oxidativo. 3. Metabolismo embrionário. 4. Biomoléculas. I. Nogueira da Costa Almeida, Nathália. *orient.* II. Título
-

CDD 636.08926

PATRICIA DE CÁSSIA DA SILVA LIMA

**UTILIZAÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO MEIO DE FECUNDAÇÃO
IN VITRO DE ÓOCITOS BOVINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal na Amazônia, da Universidade Federal do Pará, Universidade Federal Rural da Amazônia.

Data da aprovação: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Nathália Nogueira da Costa Almeida
Universidade Federal do Pará- Orientadora

Profa. Dra. Priscila Di Paula Bessa Santana – Membro Titular

Profa. Dra. Simone do Socorro Damasceno Santos
Universidade Federal do Pará- Membro Titular

Prof. Dr. Diego Dubeibe Marín
Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales – Membro Titular

Belém-PA

Outubro -2025

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação foi um caminho de aprendizado e crescimento, e não teria sido possível sem o apoio de diversas pessoas e instituições. A elas, manifesto a minha mais profunda gratidão.

Em primeiro lugar, a Deus, por iluminar meu caminho e me dar forças para superar cada desafio.

Aos meus pais, pelos ensinamentos, e de forma especial à minha mãe, Eliana, cujo apoio e torcida pelo meu crescimento profissional foram pilares essenciais. Ao meu companheiro, Fabrício, por todo apoio e por tudo que estamos construindo juntos.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal, pela oportunidade de aprendizado e crescimento acadêmico, e à sua coordenação e secretaria, pelo suporte fundamental ao longo de toda a minha trajetória. À FAPESPA, pelo imprescindível financiamento da bolsa de estudos.

Expresso minha gratidão aos professores das disciplinas cursadas, por compartilharem seus valiosos conhecimentos e por sua generosidade. De modo particular, agradeço aos professores Bruno Monteiro, Patrícia e Fabrício.

Aos colegas que cruzaram meu caminho nesta jornada, por todas as contribuições para meu aprendizado e pelas boas risadas que tornaram o caminho mais leve, em especial a Alzi, Antônio, Renata, Florentina, Luciano e Cíntia.

À equipe do Laboratório de Fertilização *in Vitro* Otávio Mitio Ohashi, pela parceria e colaboração, especialmente a Paloma, Leonardo, Bruno e Mateus Ramos.

À professora Marcela Cordeiro, uma entusiasta da pesquisa, pelo apoio essencial, sem o qual esse trabalho não seria possível. E à professora Simone Damasceno, por seu apoio e por todo o ensinamento à frente do LABFIV.

À minha orientadora, professora Nathália Nogueira, pela confiança, paciência e pelas correções criteriosas que lapidaram este trabalho, conduzindo-o com compromisso e dedicação admiráveis.

À minha amiga Laena, por acreditar em mim até mais do que eu mesma, e por seu incentivo constante e palavras de apoio em todos os momentos.

E, por fim, à minha sobrinha Adriana, por seu carinho sincero e pela alegria contagiante, que tanto me inspiram.

EPÍGRAFE

“Keep moving forward”.

(Walter Elias Disney)

RESUMO

Os meios de cultivo representam o suporte físico-químico e nutricional para a manutenção da sobrevivência e promoção do desenvolvimento de gametas e embriões *in vitro*. Visando replicar um microambiente mais próximo do *in vivo* novas formulações e adição de substâncias têm sido testadas. O plasma rico em plaquetas (PRP) apresenta serotonina e moléculas de adesão, fatores de crescimento (FGF, TGF β , PDGF, IGF e EGF), além de citocinas que podem modular de forma positiva o microambiente da fecundação e favorecer o desenvolvimento embrionário. Por suas propriedades bioativas este estudo investigou o efeito da adição de PRP ao meio de fecundação na produção de embriões bovinos *in vitro*. Complexos *cumulus* oócitos (CCOs) bovinos oriundos de abatedouro local foram fecundados na presença de 2,5%, 5% e 10 % de PRP. A expressão gênica de OCT4, IFNT, HSP70, SOD2 e GLUT1 foram avaliadas apenas nos grupos Controle, 2,5% e 5% por RT-PCR sendo realizadas 3 repetições com um *pool* de 5 embriões cada, utilizando o método de $2\Delta\Delta CT$. As taxas de clivagem (D2) e blastocisto (D8) e expressão gênica foram submetidas a ANOVA ($p < 0,05$). Em relação as taxas de clivagem e formação de blastocistos houve diferença entre os grupos Controle ($91,9 \pm 3,9$; $44,6 \pm 9,0$), 2,5% ($87,9 \pm 6,4$; $39,0 \pm 14,1$) e 5 % ($85,8 \pm 7,4$; $35,1 \pm 11,4$) em relação ao grupo 10% ($61,1 \pm 9,9$; $17,6 \pm 4,9$). Os genes OCT4 e IFNT foram mais expressos no grupo 5%. Já o HSP70 foi mais expresso nos grupos 2,5% e 5%. O gene SOD2 foi menos expresso no grupo 2,5%. Enquanto o GLUT1 foi menos expresso no grupo 5%. Portanto, o efeito do PRP foi dose-dependente com concentração de 10% apresentando efeito prejudicial em relação as taxas de clivagem e formação de blastocisto. Enquanto 5% de PRP durante o processo de fecundação promoveu melhora na qualidade dos embriões bovinos, evidenciada pela maior expressão de genes associados à competência embrionária pré-implantacional.

Palavras Chaves: Fatores de crescimento, fecundação, estresse oxidativo, metabolismo embrionário, biomoléculas.

ABSTRACT

Culture media represent the physicochemical and nutritional support necessary for maintaining the survival and promoting the development of gametes and embryos *in vitro*. Aiming to replicate a microenvironment closer to *in vivo* conditions, new formulations and the addition of various substances have been tested. Platelet-rich plasma (PRP) contains serotonin, adhesion molecules, growth factors (FGF, TGF β , PDGF, IGF, and EGF), as well as cytokines that may positively modulate the fertilization microenvironment and favor embryonic development. Due to its bioactive properties, this study investigated the effect of adding PRP to the fertilization medium on *in vitro* bovine embryo production. Bovine *cumulus*-oocyte complexes (COCs) obtained from a local slaughterhouse were fertilized in the presence of 2.5%, 5%, and 10% PRP. The gene expression of OCT4, IFNT, HSP70, SOD2, and GLUT1 was evaluated only in the Control, 2.5%, and 5% groups by RT-PCR, with three replicates consisting of *pools* of five embryos each, using the $2\Delta\Delta CT$ method. Cleavage (D2) and blastocyst (D7) rates and gene expression data were analyzed by ANOVA ($p < 0.05$). Regarding cleavage and blastocyst formation rates, differences were observed between the Control (91.9 ± 3.9 ; 44.6 ± 9.0), 2.5% (87.9 ± 6.4 ; 39.0 ± 14.1), and 5% (85.8 ± 7.4 ; 35.1 ± 11.4) groups compared with the 10% group (61.1 ± 9.9 ; 17.6 ± 4.9). The OCT4 and IFNT genes were more highly expressed in the 5% group, whereas HSP70 showed greater expression in the 2.5% and 5% groups. The SOD2 gene was less expressed in the 2.5% group, while GLUT1 showed lower expression in the 5% group. Therefore, the effect of PRP was dose-dependent, with the 10% concentration exhibiting a detrimental effect on cleavage and blastocyst formation rates. In contrast, 5% PRP during the fertilization process improved the quality of bovine embryos, as evidenced by the higher expression of genes associated with preimplantation embryonic competence.

Keywords: Growth factors, fertilization, oxidative stress, embryonic metabolism, biomolecules.

LISTA DE ABREVIACÕES

| | |
|--------------|---|
| PIVE | Produção <i>in vitro</i> de embriões |
| FBS | Soro fetal bovino |
| PDGF | Fator de crescimento derivado de plaquetas |
| IGF-1 | Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 |
| VEGF | Fator de crescimento endotelial vascular |
| TGF- β | Fator de crescimento transformador beta |
| EGF | Fator de crescimento epidérmico |
| ROS | Espécies reativas de oxigênio |
| FIV | Fecundação <i>in vitro</i> |
| FSH | Hormônio fliculo-estimulante |
| MIV | Maturação <i>in vitro</i> |
| CIV | Cultivo <i>in vitro</i> |
| ASBIA | Associação Brasileira de Inseminação Artificial |
| SOF | Synthetic Oviduct Fluid |
| TCM-199 | Medium 199 modificado |
| ICM | Massa celular interna |
| TALP | Tyrode's albumin lactate pyruvate |
| AR | Reação acrossmica |
| T3 | Triiodotironina |
| T4 | Tiroxina |
| PRP | Plasma rico em plaquetas |
| ATP | Adenosina Trifosfato |
| ADP | Adenosina difosfato |
| FC | Fatores de crescimento |
| CCO | Complexo cúmulos-oócito |
| EPI | Epiblasto |
| HB | Hipoblasto |
| TRA | Tecnologia de reprodução assistida |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Histórico comparativo do crescimento da produção de embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro* no Brasil de 1993-2023.

Figura 2 - Fatores responsáveis pelo aumento da geração de ROS em um ambiente de Tecnologia de reprodução assistida.

Figura 3- Descrição dos eventos complexos e coordenados que ocorrem na fecundação.

Figura 4- Representação esquemática da organização estrutural e do conteúdo das plaquetas.

Figura 5- Fluxograma experimental. MIV: maturação *in vitro*; FIV: fertilização *in vitro*; CIV: cultivo *in vitro*.

Figura 6- Descrição do processamento do sangue para obtenção do PRP.

Figura 7- Aspecto macroscópico do meio de fecundação suplementado com plasma rico em plaquetas (PRP) ao longo de 24 horas de interação com os gametas.

Figura 8- Expressão gênica dos embriões fecundados com PRP.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -Fatores de crescimento presentes no PRP associados á reprodução e seus efeitos sobre gametas e embriões.

Tabela 2- Dados dos genes selecionados para PCR de tempo real.

Tabela 3-Taxas de clivagem e blastocistos nos grupos suplementados com diferentes concentrações de PRP.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 11 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 12 |
| 2.1 AVANÇOS E PERSPECTIVAS NA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS..... | 12 |
| 2.2 A IMPORTÂNCIA DOS MEIOS DE CULTIVO NA PIVE | 14 |
| 2.3 FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i> (FIV) | 18 |
| 2.4 PLASMA RICO EM PLAQUETAS | 21 |
| 2.5 EXPRESSÃO GÊNICA DE EMBRIÕES BOVINOS PRÉ-IMPLANTACIONAIS | 27 |
| 2.5.1 OCT 4/ POU5F1 | 27 |
| 2.5.2 IFNT | 28 |
| 2.5.3 HSP70 | 29 |
| 2.5.4 GLUT1 | 29 |
| 2.5.5 SOD2 | 31 |
| 3. HIPÓTESE | 32 |
| 4. OBJETIVOS..... | 32 |
| 4.1 GERAL | 32 |
| 4.2 ESPECÍFICOS | 32 |
| 5. METODOLOGIA | 33 |
| 5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL | 33 |
| 5.2 PRODUÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS | 33 |
| 5.3 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES | 35 |
| 5.3.1 Obtenção Dos Ovários | 35 |
| 5.3.2 Recuperação e seleção dos CCOs | 35 |
| 5.3.3 Maturação <i>in vitro</i> | 35 |
| 5.3.4 Fecundação <i>in vitro</i> | 36 |
| 5.3.5 Cultivo <i>in vitro</i> | 36 |
| 5.4. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA | 37 |
| 5.4.1 COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS | 37 |
| 5.4.2 EXTRAÇÃO DE RNA E AMPLIFICAÇÃO DOS GENES | 37 |
| 5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 38 |
| 6. RESULTADOS | 38 |
| 6.1 TAXAS DE CLIVAGENS E DE FORMAÇÃO DE BLASTOCISTOS | 38 |
| 6.2 EXPRESSÃO GÊNICA | 40 |
| 7. DISCUSSÃO | 42 |
| 8. CONCLUSÕES | 46 |
| REFERÊNCIAS | 47 |

1. INTRODUÇÃO

Os avanços tecnológicos e metodológicos na produção *in vitro* de embriões (PIVE) evidenciam uma tendência crescente entre os produtores de material genético em substituir a transferência de embriões por múltiplas ovulações (MOET), método tradicional de produção *in vivo*, pela aplicação de técnicas *in vitro*. Esse cenário tem impulsionado investigações voltadas ao aprimoramento da eficiência e da reprodutibilidade dos protocolos utilizados na PIVE (FERRÉ et al., 2020).

Os meios de cultivo representam um dos principais pontos de refinamento a serem otimizados na PIVE, devido à sua influência determinante sobre a interação entre as células e o microsistema *in vitro* durante o desenvolvimento embrionário. Esses sistemas têm a função de reproduzir, de forma controlada, o microambiente fisiológico, tanto em seus aspectos bioquímicos quanto físico-químicos (ABD EL-AZIZ et al., 2016). Compostos por soluções complexas de nutrientes, íons e fatores de crescimento, os meios de cultivo interagem diretamente com as células, modulando seus processos metabólicos e de sinalização, o que impacta de maneira decisiva o sucesso do cultivo embrionário (BAUST et al., 2017).

O PRP constitui uma fonte biológica concentrada de fatores de crescimento, moléculas de adesão e citocinas envolvidas em processos de proliferação celular, diferenciação, proteção contra o estresse oxidativo e modulação da apoptose (BEITIA et al., 2022). A incorporação do PRP em meios de cultivo tem sido explorada em estudos voltados à maturação de oócitos e ao cultivo embrionário bovino, demonstrando eficiência comparável ao soro fetal bovino (FBS) e promovendo condições bioquímicas favoráveis à manutenção da integridade celular (MOULAVI et al., 2021). Souza et al. (2024) observaram que a utilização de 5% de PRP durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos resultou em taxas de clivagem e formação de blastocistos semelhantes às obtidas com FBS, corroborando o potencial do PRP como alternativa biológica de inserção aos meios de cultivo.

A elevada concentração de fatores de crescimento presentes no PRP, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e o fator de crescimento epidérmico (EGF), confere-lhe propriedades mitogênicas, quimiotáticas e angiogênicas de grande relevância biológica (SANTOS et al., 2018). Esses fatores atuam de maneira sinérgica na estimulação da proliferação celular, migração e diferenciação de células somáticas e germinativas, além de favorecerem a formação de novos vasos e a regulação da matriz extracelular, promovendo um

ambiente mais propício à comunicação e estabilidade celular. Em teoria, tais características podem contribuir significativamente durante a etapa de FIV, criando um microambiente mais equilibrado e funcional, capaz de favorecer os eventos complexos de reconhecimento e fusão entre oócito e espermatozóide (NAVY et al., 2023; CAMARGO et al., 2013).

Cabe ressaltar ainda, que durante a fecundação, espécies reativas de oxigênio (ROS) desempenham um papel essencial em processos como capacitação espermática e ativação oocitária, contudo, o excesso de ROS pode causar danos celulares e comprometer o desenvolvimento embrionário (MAUCHART et al., 2023). Nesse contexto, Souza et al. (2024), observaram, um aumento na expressão gênica associada ao estresse oxidativo em embriões cultivados em meios suplementados com PRP, demonstrando o aumento da capacidade celular de resposta e adaptação frente ao estresse. Diante dessas evidências, torna-se relevante investigar se a adição de PRP ao meio de FIV pode favorecer o desenvolvimento embrionário, refletindo em melhores taxas de clivagem e maior qualidade dos embriões produzidos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AVANÇOS E PERSPECTIVAS NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS.

Desde a observação da formação da primeira célula embrionária a partir de um oócito de estrela-do-mar, a reprodução animal assistida manteve uma trajetória de expansão gradual e consistente de aperfeiçoamento contínuo das biotecnologias aplicadas ao melhoramento genético. A PIVE em animais de produção teve início na década de 1970 e apresentou resultados promissores na década seguinte, com o nascimento do primeiro bezerro sadio oriundo de FIV em 1981 (BRACKETT et al., 1982). Desde então, a PIVE consolidou-se como ferramenta estratégica para o progresso genético, reprodutivo e produtivo de rebanhos, representando um marco científico e tecnológico na área da biotecnologia da reprodução animal.

Em 2016, a PIVE atingiu um ponto de inflexão histórico, quando o número de embriões produzidos *in vitro* superou, pela primeira vez, aqueles obtidos por métodos *in vivo* em escala mundial (IETS, 2017), evidenciando sua crescente aplicabilidade e eficiência. Todavia, segundo Viana et al., (2024) fatores macroeconômicos, como a recessão observada entre 2014 e 2016, impactaram negativamente os investimentos em programas de melhoramento genético. Esse cenário foi posteriormente agravado pela pandemia de COVID-19, que ocasionou uma retração de aproximadamente 20,2% na coleta de embriões por superovulação (*in vivo*), em

virtude do aumento dos custos operacionais e da limitação na disponibilidade do hormônio folículo-estimulante (FSH).

Apesar dessas adversidades, o Brasil, consolidou-se como um dos principais produtores mundiais de embriões bovinos *in vitro*, com estimativas que indicam a iminente superação da marca de 500 mil embriões anuais, reafirmando sua relevância no cenário global de biotecnologia da reprodução (VIANA, 2024).

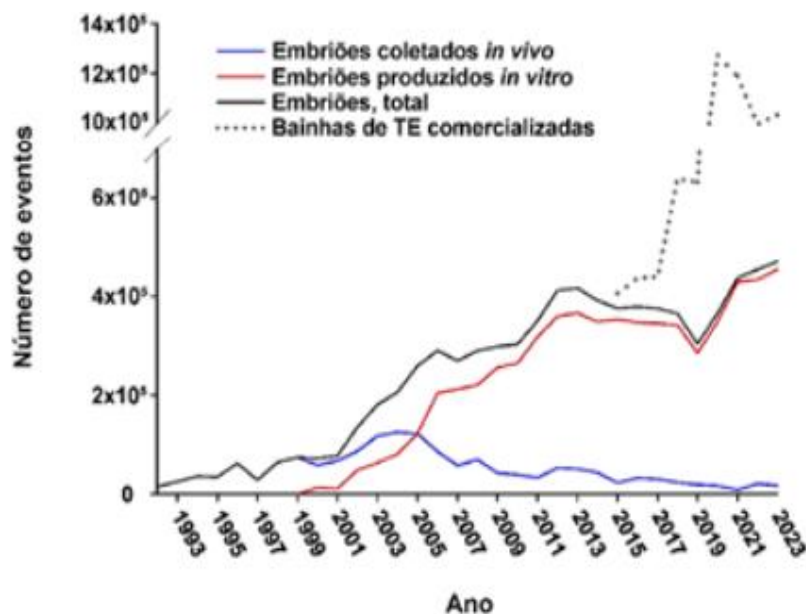


Figura 1: Histórico comparativo do crescimento da produção de embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro* no Brasil de 1993-2023. Fonte: (VIANA., 2024).

Em 2019, Gonçalves et al, publicaram um estudo que estabelece um panorama sobre os 20 primeiros anos de registros de transferências de embrião bovinos produzidos *in vitro* por empresas comerciais no Brasil, uma vez que o país se tornou referência mundial na adoção da técnica de PIVE. Em sua análise o estudo discorre que em apenas duas décadas houve uma transformação que revolucionou a agropecuária nacional, transformando o país de importador de alimentos a um reconhecido celeiro mundial, devido a um conjunto de novas técnicas e processos, fruto do desenvolvimento técnico-científico que chegou ao mercado.

O avanço das tecnologias aplicadas à produção *in vitro* de embriões, incluindo o uso de sêmen sexado, seleção genômica, coleta de oócitos por punção ovariana (OPU) e aprimoramento dos sistemas de co-cultura, tem ocorrido de forma expressiva, impulsionado tanto pelo interesse comercial quanto pela maior aceitação desses recursos. Tais inovações aceleram o melhoramento genético animal, ampliando a eficiência reprodutiva e promovendo ganhos na qualidade genética dos rebanhos (FERRÉ et al., 2020).

Entre os diversos fatores que impulsionaram o avanço das biotecnologias reprodutivas, o desenvolvimento de meios de cultivo adequados para cada etapa do processo destaca-se como elemento de grande relevância. A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é organizada em três etapas fundamentais: maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV), cada uma exigindo meios específicos que atendam às suas necessidades bioquímicas e fisiológicas. Além disso, os metabólitos presentes nesses meios podem modular o desenvolvimento embrionário *in vitro*, exercendo efeitos de longo prazo sobre as células (MILAZZOTO et al., 2022).

Apesar dos avanços no desenvolvimento de meios adequados para cada fase da PIVE, as condições de cultivo precisam superar a baixa viabilidade dos embriões produzidos *in vitro*, fato diretamente relacionado com a falha dos sistemas de cultivos atuais, que ainda não conseguiram replicar completamente o ambiente *in vivo*. demonstrado a necessidade de uma compreensão mais profunda da fisiologia embrionária, incluindo substratos metabólicos preferenciais e vias utilizadas por embriões de alta qualidade (KRISHER; HERRICK, 2024).

Nas próximas duas décadas, as perspectivas para a produção e reprodução bovina apontam para uma pecuária de precisão, com uma intensificação do uso de biotecnologias para a produção de animais geneticamente superiores (LUCY; POHLER, 2025). Atualmente, o Brasil, ainda não possui um referencial estatístico preciso sobre o uso de embriões bovinos e o impacto das técnicas de reprodução, este cenário deve mudar em breve, com o lançamento do Índice Embrião, o primeiro levantamento nacional sobre a produção e a comercialização de embriões bovinos no país, iniciativa e lançamento da Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA). A proposta é consolidar dados técnicos de um setor que cresce de forma acelerada, mas que ainda opera com baixa integração estatística.

2.2 A IMPORTÂNCIA DOS MEIOS DE CULTIVO NA PIVE

Os meios de cultivo desempenham um papel fundamental na PIVE, pois fornecem o ambiente necessário para o desenvolvimento embrionário desde a maturação do oócito até o cultivo pós-fecundação. A composição e as condições desses meios influenciam diretamente a qualidade e a viabilidade dos embriões gerados.

Os meios de cultivo, são de certa forma, soluções desenvolvidas para imitar o ambiente fisiológico, em condições controladas na qual uma mistura complexa de nutrientes e fatores de crescimento, assim como outros componentes que são adicionados, de acordo com a necessidade do cultivo celular, tem uma interação direta com a célula, influenciando o seu

desenvolvimento, alterando seu conteúdo, como consequência benéfica ou prejudicial ao cultivo (BAUST, 2017).

Na PIVE os meios adequados promovem a manutenção da homeostase metabólica, modulam o estresse oxidativo e favorecem a comunicação entre células embrionárias, por outro lado, alterações na concentração de componentes, pH ou osmolaridade podem gerar condições subótimas, levando ao acúmulo de ROS, disfunção mitocondrial, atraso no desenvolvimento embrionário ou apoptose, comprometendo a eficiência do cultivo *in vitro* (AGARWAL et al., 2022).

A composição do meio, juntamente com práticas laboratoriais como manipulação celular e exposição à luz, as condições ambientais da incubação interferem na manutenção da homeostase metabólica e no desenvolvimento embrionário *in vitro* atuando como potenciais estressores oxidativos nos embriões, como descrito na figura 2.

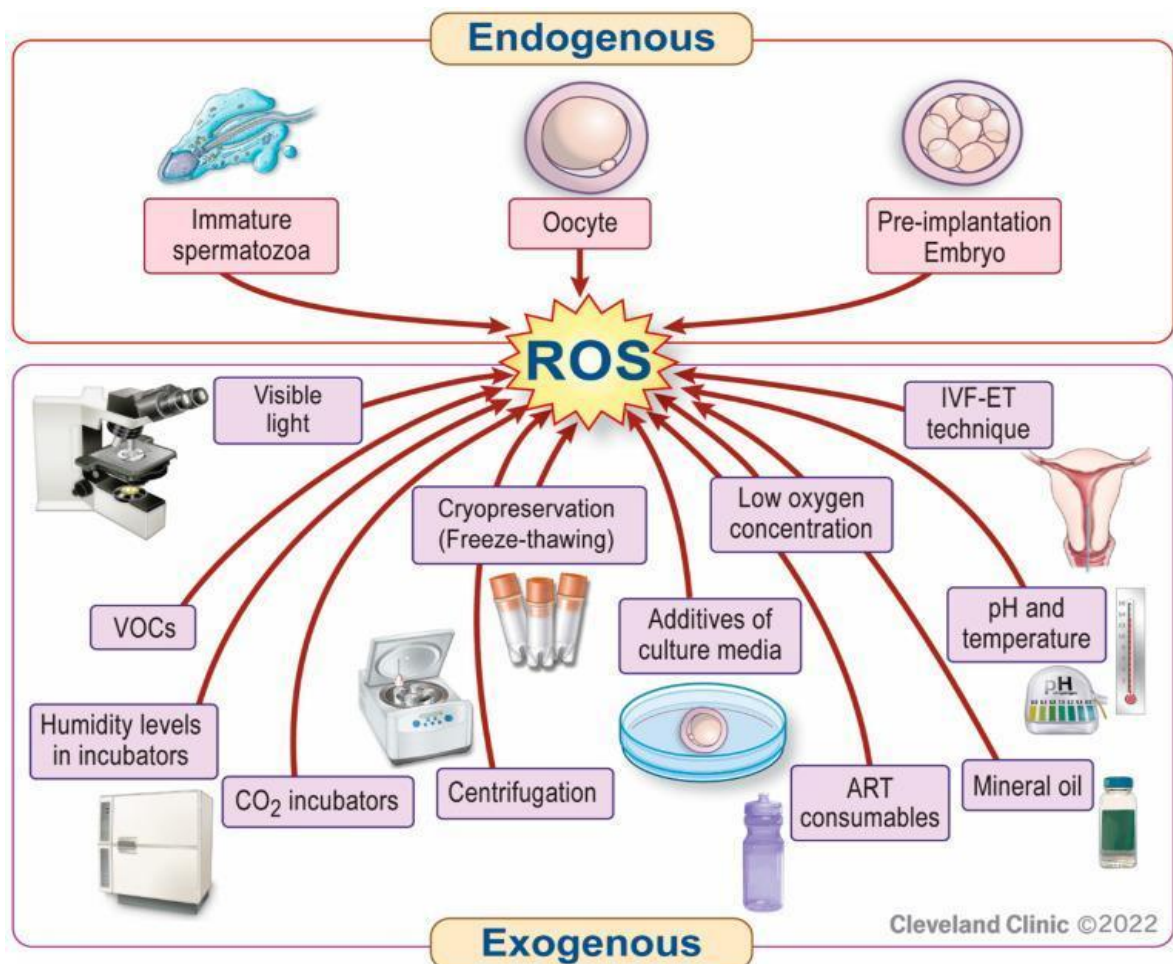


Figura 2: Fatores responsáveis pelo aumento da geração de ROS em um ambiente de TRA (técnicas de reprodução assistida). Espécies reativas de oxigênio (ROS) podem ser produzidas intracelularmente a partir de espermatozoides, ovócitos ou embriões imaturos. Fontes externas ou gatilhos para a produção de ROS incluem tensão de oxigênio inadequadamente alta ou ultrabaixa, contaminação do ar do laboratório, incubadoras de CO₂ ou consumíveis de TRA (por exemplo, plásticos, bisfenóis) com compostos orgânicos voláteis (COVs). Além disso, centrifugação, luz visível, temperatura, níveis de umidade em incubadoras, óleo mineral, aditivos em meios de cultura, a técnica de fertilização *in vitro* (FIV)-transferência de embriões (TE) e a criopreservação de gametas ou embriões também contribuem para a geração de ROS em um ambiente de TRA. Fonte: (Agarwal et al., 2022).

Há uma diversidade de meios de cultivo utilizados na PIVE, classificados conforme o grau de conhecimento sobre sua composição química: definidos, semidefinidos e indefinidos. Meios quimicamente definidos possuem uma composição exata e conhecida, que apoiam o desenvolvimento de embriões pré-implantados *in vitro* permitindo um controle preciso dos nutrientes e fatores de crescimento, (MEN H, 2024). Um exemplo de meio definido é o SOF (Synthetic Oviduct Fluid). Já os meios semidefinidos contêm componentes cujas concentrações são parcialmente conhecidas, como extratos de levedura ou peptonas, oferecendo um equilíbrio entre controle e complexidade. Um exemplo é o TCM-199 (Medium 199 modificado) um sistema de co-cultura de embriões bovinos modificado por células somáticas, como células epiteliais do oviduto bovino (EDWARDS et al.,1997).

Por fim, os meios quimicamente indefinidos ou complexos, apresentam componentes não identificados e/ou em concentrações desconhecidas são chamados de meios quimicamente indefinidos. Este é o caso dos meios que utilizam soro fetal bovino (SFB) e/ou albumina sérica (REHMAN et al., 2001).

O soro fetal bovino, é considerado um facilitador de adesão e crescimento celular, que já está bem consolidado. Em seu conteúdo encontramos proteínas plasmáticas (albumina, proteínas de adesão, fatores de crescimento, globulinas). Para regular o metabolismo celular, também contém insulina, fatores de crescimento semelhante a insulina, vitaminas e minerais (BAUST et al.,2007).

Diversos suplementos têm sido incorporados aos meios de cultivo na PIVE, de forma experimental, visando entender os diferentes aspectos do metabolismo celular e o impacto no desenvolvimento embrionário. Entre os suplementos mais utilizados estão os antioxidantes, aminoácidos, hormônios e fatores de crescimento. A adição de antioxidantes como acetil-L-carnitina, N-acetil-L-cisteína e ácido alfa-lipoico exclusivamente ao meio de FIV ou ao meio de CIV aumentou o número de células do trofotoderma e de massa celular interna (ICM) no blastocisto em modelos murinos (TRUONG & GARDNER, 2017).

O desenvolvimento dos meios e a suplementações adicionadas devem levar em conta a dinâmica da fisiologia do gameta, do zigoto e do embrião e as conseqüentes mudanças nas necessidades de carboidratos e aminoácidos. Gardner et al (1998), relataram a importância de modificar os meios de forma sequencial, respeitando a demanda celular de acordo com a necessidade fisiológica, incluindo modificações no conteúdo de carboidratos e aminoácidos podem interferir diretamente nas taxas de clivagem, blastocistos e de concepção.

O meio de fecundação deve ser cuidadosamente formulado para refletir a disposição metabólica preferencial dos gametas e embriões nos estágios iniciais de desenvolvimento. Nessa fase, o microambiente ovidutal caracteriza-se pela predominância de piruvato e lactato como substratos energéticos primários enquanto o excesso de glicose pode causar estresse oxidativo e gerar acúmulo de metabólitos tóxicos, comprometendo a viabilidade embrionária (MCCLELLAND et al., 2016).

A presença de aminoácidos não essenciais nos meios de FIV e CIV promovem regulação osmótica, permitindo que o oócito e o embrião mantenham sua integridade morfológica (LEESE; MCKEEGAN; STURMEY, 2021) mesmo sob condições de elevada osmolaridade, atuando como uma espécie de escudo protetor que sustenta a conformação celular e o equilíbrio hídrico. De acordo com Gonçalves et al. (2002), a introdução de aminoácidos como penicilamina, hipotaurina e epinefrina no meio TALP-Fert melhora a atividade espermática, protegendo contra o estresse oxidativo e facilitando a penetração espermática no oócito. Esses componentes, portanto, não apenas contribuem para a manutenção da homeostase celular, mas também favorecem a fecundação (KANG et al., 2014).

Em relação a concentração de compostos lipídicos devem ser criteriosamente controladas, uma vez que a adição de fontes lipídicas exógenas, como o soro fetal bovino, pode introduzir variabilidade indesejada na composição do meio. Essa variabilidade afeta a estabilidade das membranas espermáticas, o equilíbrio oxidativo dos gametas e o metabolismo lipídico embrionário, comprometendo a qualidade e a criotolerância dos blastocistos produzidos (RIZOS et al., 2003). Diversas classes de lipídios (como fosfolipídios, lipídios neutros e glicolipídios) participam de maneira coordenada em todas as etapas da fertilização, desde a espermatogênese e maturação até processos fisiológicos vitais, como a motilidade do esperma, capacitação, reação acrossômica (AR) e fusão com o óvulo. Durante a capacitação, o esperma sofre alterações como a perda de colesterol e fosfolipídios, e a perda da assimetria fosfolipídica, que são eventos necessários para aumentar a fluidez da membrana espermática favorecendo a fecundação (SHAN et al., 2021).

As melhorias de otimização de meios de cultivo, frequentemente usam fatores de crescimento e citocinas que atuam na sinalização celular, influenciando o crescimento, a sobrevivência, a proliferação, a diferenciação e a migração celular durante o desenvolvimento embrionário. Em um estudo conduzido por Bera et al., (2024) no qual testou a adição de uma associação de fatores de crescimento e os hormônios triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) em diferentes concentrações em todas as etapas da PIVE, concluindo que todas as combinações de

fatores de crescimento (PDGF+IGF, EGF+FGF e T3+T4) suplementadas em várias concentrações no meio de cultura melhoraram as taxas de clivagem e blastocisto.

Atualmente, poucos estudos têm abordado intervenções direcionadas especificamente ao meio de FIV. No entanto, pesquisas recentes indicam a relevância de aprimorar essa etapa da PIVE, evidenciando resultados promissores quanto à qualidade embrionária. Um exemplo é o estudo que investigou a adição de fluido folicular bovino como suplemento ao meio de FIV, demonstrando efeitos positivos sobre o desenvolvimento embrionário. A proposta revelou que a suplementação com 5% de fluido folicular bovino promoveu um ambiente mais favorável à fecundação, otimizando a qualidade embrionária quanto à menor expressão dos genes pró-apoptótico e de resposta ao estresse celular (HOMOBONO et al., 2024).

Adicionalmente, tem sido discutido que os sistemas de cultura estática podem não estar recriando adequadamente o ambiente de desenvolvimento do embrião necessário. Os sistemas dinâmicos, por outro lado, permitem uma alteração gradual, precisa e específica do tempo dos meios de cultura, restauram os nutrientes consumidos, fornecem novos nutrientes e removem resíduos e derivados metabólicos tóxicos, oferecem a automação de certos processos (desnudação), ao mesmo tempo em que facilitam o manuseio básico de gametas/embriões e reduzem o estresse ambiental (WHEELER E RUBESSA, 2017).

2.3 FECUNDAÇÃO *IN VITRO* (FIV)

A PIVE é uma biotécnica que permite a obtenção de um embrião, produzido fora do organismo materno. Para isso, é necessário um ambiente laboratorial controlado e seguir todas as etapas do processo. A FIV é um processo que, por meio da incubação de oócitos maturados com espermatozoides capacitados em meio próprio, acontece fusão das membranas e emparelhamentos dos pró-núcleos, originando um zigoto (OLIVEIRA et al., 2014). Portanto, após a MIV e a separação de espermatozoides viáveis deve-se desenvolver um meio adequado para a capacitação espermática e a fecundação. O sucesso da FIV está atrelado ao fornecimento de condições favoráveis. O co-cultivo dos gametas é realizado em gotas de 50 a 100 µl em placa de petri por período de 18 a 24 horas. O meio de cultura precisa mimetizar o ambiente das tubas uterinas, com suplementação de íons essenciais, proteínas (como albumina sérica) e fontes energéticas como glicose e piruvato. Manter a temperatura em 38,5°C e uma atmosfera controlada com 5% CO₂ e de 5-20% de O₂, sendo o sistema de baixa tensão de oxigênio mais eficiente para o desenvolvimento pois é mais próximo do fisiológico (GORDON, 2003; RIZOS et al., 2008).

A capacitação espermática, é um processo bioquímico em que os espermatozoides adquirem a capacidade de fertilizar o óvulo, exigindo grandes quantidades de energia. Em várias espécies de mamíferos, a motilidade espermática e a manutenção da integridade da membrana dependem predominantemente do ATP gerado pelo metabolismo não aeróbico da glicose via glicólise (DU PLESSIS et al. 2015).

Os espermatozoides capacitados, precisam atravessar diversas barreiras até a penetração do oócito como demonstrado na figura 3. Inicialmente o gameta masculino deve atravessar a matriz extracelular composta pelas células do *cúmulus oóforo* que envolve o ovócito, seguindo pela zona pelúcida, uma matriz glicoproteica que funciona como barreira física e seletiva de espécie-específica. A ligação do espermatozoide às glicoproteínas da zona pelúcida induz a reação acrossômica, caracterizada pela exocitose do conteúdo enzimático do acrossomo, permitindo a digestão localizada da zona e a progressão do espermatozóide até a membrana plasmática do oócito (GADELLA et al.,2001).

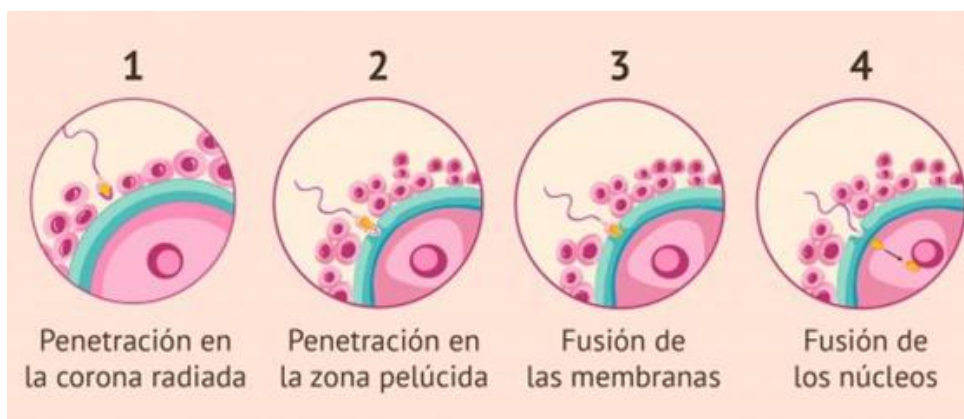


Figura 3 Descrição dos eventos complexos e coordenados que ocorrem na fecundação. 1) Espermatozoide capacitado; 2) Espermatozóide passando pela reação acrossômica, na qual se formam perfurações no acrossoma; 3) Espermatozóide digerindo um caminho pela zona pelúcida, através de enzimas liberadas do acrossoma; 4) Espermatozóide após entrar no citoplasma do oócito, ocorrendo a fusão das membranas plasmáticas dos gametas. FONTE: <https://www.studocu.com/es/document/universidad-de-salamanca/anatomia-e-histologia-humanas/anatomia-tema-1-desarrollo-embionario-y-fecundacion/140378301>

Geralmente, os espermatozoides utilizados na PIVE são de sêmen congelado. A capacitação pode ser induzida *in vitro* por agentes como a heparina, que promove modificações na membrana plasmática do espermatozoide, incluindo a perda de proteínas do plasma seminal e colesterol, além de alterações no pH intracelular, cálcio e níveis de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP). Essas mudanças permitem que o espermatozóide realize a reação acrossomal e penetre a zona pelúcida do óvulo (PARRISH et al., 2014).

A concentração espermática durante a capacitação também é um fator relevante, pois concentrações elevadas podem resultar em poliespermia, quando mais de um espermatozoide

penetra no óócito, resultando em um embrião com número anômalo de cromossomos, comprometendo o desenvolvimento embrionário. Outras causas de poliespermia estão relacionadas a óócitos imaturos ou envelhecidos, anormalidades na zona pelúcida, ou suplementos ineficazes (WANG et al. 2003).

O preparo do sêmen para fertilização *in vitro* (FIV) inicia-se com a retirada da paleta contendo o sêmen congelado do botijão de nitrogênio líquido, seguida pela descongelação em banho-maria a 37°C por cerca de 30 segundos. Após o descongelamento, o sêmen é submetido a técnicas de separação celular para selecionar os espermatozoides mais viáveis e móveis. Dentre os métodos mais utilizados destacam-se o gradiente de Percoll e o swim up. A técnica de separação espermática utilizando Percoll tem se mostrado mais eficaz do que a técnica de swim-up, especialmente em termos de recuperação de maior número de espermatozoides móveis e com melhor qualidade morfológica. Devido aos gradientes de densidade como o Percoll permitirem uma seleção mais rigorosa, removendo células mortas, detritos e espermatozoides com danos no DNA, o que resulta em amostras com melhor potencial fertilizante (GALLI et al., 1996; HENKEL et al., 2003; PENARIOL, 2017).

O meio de fecundação *in vitro* FERT-TALP (Tyrode-albumina-lactato-piruvato) é o mais usado para a fertilização. A adição de epinefrina e hipotaurina presentes no meio FERT-TALP têm o propósito de melhorar o ambiente embrionário possibilitando a estabilização do pH, proteção contra o estresse oxidativo, promoção do desenvolvimento e melhora da viabilidade embrionária (MILLER et al., 1994).

Outro aspecto relevante é o estresse oxidativo oriundo dos sistemas de fertilização *in vitro*. Mauchart et al. (2023) descrevem sobre o estresse oxidativo em técnicas de reprodução assistida, destacando a importância da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) para regulação das taxas de proliferação celular e apoptose. No entanto, os níveis elevados de ROS são extremamente prejudiciais devido aos danos aos lipídios, DNA e proteínas. O tempo de manipulação *in vitro* e a exposição à luz contribuem para maior índice de ROS *in vitro* do que os produzidos *in vivo*. Adicionalmente, cabe mencionar aqui, os efeitos deletérios da criopreservação que podem induzir alterações epigenéticas e aumentar a produção de ROS, levando a danos no DNA e à redução da qualidade de embriões e gametas preservados, levando a redução das taxas de fecundação (SILVA & GUERRA, 2011).

2.4 PLASMA RICO EM PLAQUETAS

O Plasma rico em plaquetas (PRP), é uma expressão usada genericamente para descrever uma suspensão de plasma obtida a partir do sangue total, preparado de forma a conter concentrações de plaquetas superiores às encontradas normalmente no sangue circulante (ALECRIM, OLIVEIRA & LEITE, 2023). O processamento do PRP envolve a separação das plaquetas com todas as suas propriedades, podendo, assim, ser considerado uma fonte autógena de fatores de crescimento, pois trata-se de princípio terapêutico inovador, acelerando as etapas de reparo da ferida (GASPERINI, 2003). Diferentes técnicas para preparação de PRP podem ser encontradas na literatura. Cada método de preparação tem como objetivo criar um produto final com uma bioação particular e, conseqüentemente, com uma aplicação clínica específica (BOS-MIKICH et al., 2018).

As plaquetas são fragmentos celulares anucleados originários dos megacariócitos da medula óssea (ITALIANO et al., 2002). Embora sejam reconhecidas por seu papel crucial na hemostasia e coagulação, as plaquetas desempenham um papel muito mais amplo na fisiologia. Além de formar coágulos e prevenir sangramentos, essas células sanguíneas estão envolvidas em diversos processos biológicos, inflamatórios, neoplásicos e imunológicos (NAGY et al., 2023).

A ativação plaquetária é um processo complexo desencadeado por diversos estímulos, conhecidos como agonistas. Entre os principais agonistas plaquetários, destacam-se a trombina, o colágeno, a adenosina difosfato (ADP), os tromboxanos e a serotonina (ATKINSON et al., 2021). Elas possuem várias moléculas solúveis, fatores, mediadores, citocinas, quimosinas e neurotransmissores como a serotonina em seus grânulos. Também possuem múltiplas moléculas de adesão e receptores em sua superfície (NAGY et al., 2023).

Os fatores de crescimento (FC) são polipeptídios que promovem a proliferação, diferenciação e quimiotaxia, induzindo a migração de variadas células. Eles estão envolvidos na regeneração tecidual, cicatrização de feridas, crescimento celular e reparo de tecidos. Muitos destes existem em várias isoformas, com diversos tipos de receptores presentes nas feridas, o que aumenta a complexidade de suas funções. São capazes de induzir efeitos em múltiplos tipos de células e provocar uma série de funções biológicas em diversos tecidos. E o efeito sinérgico de diferentes fatores tem uma consequência positiva na cicatrização (CARMARGO, 2013).

Dentre os tipos de FC, dois tipos de grânulos estão presentes nas plaquetas, os densos e alfa (α) (PAVANI et al., 2017), como ilustrado na figura 4, onde estão representados todos os componentes plaquetários. Os densos secretam adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato

(ATP), serotonina, cálcio, pirofosfato, P-selectina, fator de transformação do crescimento β , catecolaminas e guanosina di e trifosfato. Já os grânulos alfas secretam FC que constituem um grupo de polipeptídeos com ação importante em diversas etapas do reparo tecidual, que incluem uma série de proteínas denominadas genericamente de fatores de crescimento derivados de plaquetas (DUSSE et al., 2008; CAMARGO, 2013).

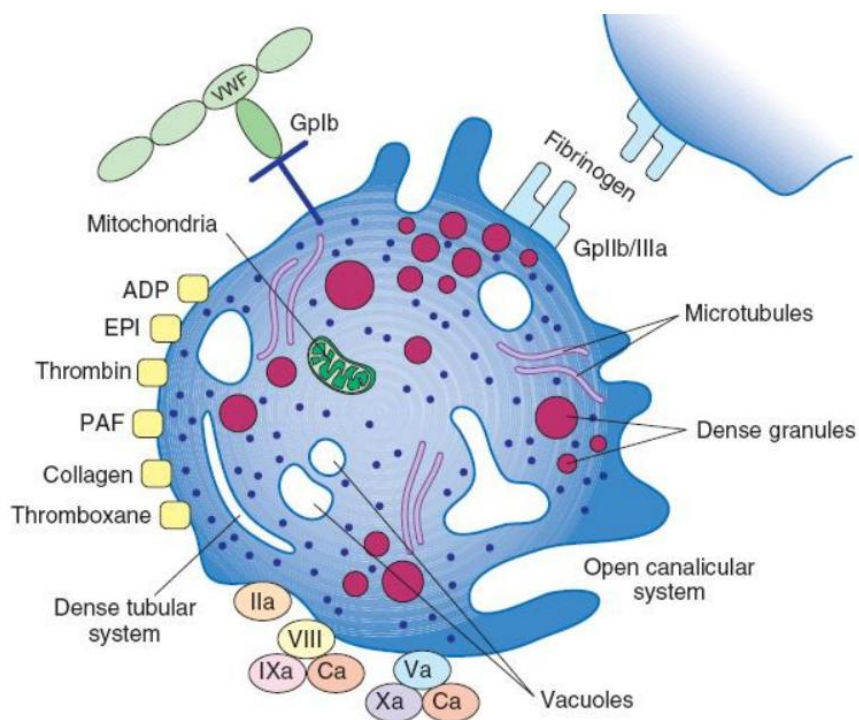


Figura 4. Representação esquemática da organização estrutural e do conteúdo das plaquetas. A membrana plaquetária contém glicoproteínas (complexos GPI/IX e GPIIb/IIIa) envolvidas na adesão e agregação. No interior, os grânulos alfa armazenam proteínas bioativas e fatores de crescimento, como PDGF, TGF- β , FGF, VEGF e EGF. Além de PF4, β -tromboglobulina, Fator V, Fator de von Willebrand (FVW) e fibrinogênio (FI). Os grânulos densos (δ) contêm ATP, ADP, cálcio e serotonina, enquanto o sistema tubular denso participa do armazenamento de cálcio e da síntese de ácido araquidônico, precursor de prostaglandinas (PG) e tromboxano A₂ (TXA₂). A atmosfera periplaquetária compreende o microambiente ao redor da plaqueta ativada, onde o Fator 3 plaquetário fornece o suporte fosfolipídico (PL) necessário para as reações da coagulação e para a liberação coordenada dos fatores de crescimento derivados dos grânulos alfa. Fonte: https://www.hematologia.hc.edu.uy/images/Teorico_3__Hemostasia_2015

Entre os fatores de crescimento presentes nos grânulos α , destacam-se: três isômeros do fator de crescimento derivado de plaquetas (Platelet Derived Growth Factors - PDGF) – PDGF_{aa}, PDGF_{bb} e PDGF_{ab}; que desempenham um papel crucial na fase inicial do processo de cicatrização. Esses fatores, liberados pelas plaquetas ativadas, exercem uma ampla gama de ações biológicas que promovem a regeneração tecidual.

Os fatores de crescimento transformadores alfa (TGF- α) apresentam uma interessante relação com o fator de crescimento epidérmico (EGF). Ambos se ligam ao mesmo receptor de tirosina quinase, desencadeando uma cascata de sinalização intracelular semelhante. Enquanto o β (TGF- β), apresentam três isômeros, TGF β -1, TGF β -2 e TGF β -3 que estimulam os

fibroblastos a produzirem colágeno, favorecendo a cicatrização de feridas e reparo de tecido conjuntivo. Também favorece a regeneração de tecido ósseo, uma vez que melhoram a osteogênese (HUANG et al., 2014).

Enquanto os fatores de crescimento epitelial (Epithelial Growth Factor - EGF), desempenham um papel fundamental na reparação de tecidos, incluindo a pele. Um dos mecanismos chave envolvidos na cicatrização cutânea é a proliferação e migração de células epidérmicas para cobrir a ferida. Diversos peptídeos bioativos, presentes em fatores de crescimento como os derivados de plaquetas (PDGF) (ZENKER, 2010).

Além disso, dois isômeros do fator de crescimento semelhante a insulina (Insulin-like Growth Factor - IGF-1 e IGF-2) promovem a síntese de colagenase e prostaglandina E2 em fibroblastos, sendo também responsáveis pela mitose destas células. O fator de crescimento endotelial vascular (Vascular Endothelial Growth Factor - VEGF), é um potente indutor de neovascularização, quimiotaxia e proliferação de células endoteliais que aumenta a permeabilidade vascular. Por sua vez, o fator de angiogênese derivado da plaqueta (Platelet-derived Angiogenesis Factor – PDAF) age estimulando a angiogênese. Enquanto o fator plaquetário 4 tem ação quimiotática sobre leucócitos polimorfonucleares e monócitos.(Platelet factor 4 - PF-4) (DONADUSSI, 2012). Dessa maneira, a grande variedade de elementos encontrados nos grânulos de plaquetas atua sinergicamente, em condições fisiológicas normais, nas células locais para promover a cicatrização de feridas (BOS-MIKICH et al., 2018). Na tabela 1, logo abaixo, apresenta os fatores crescimento derivados das plaquetas.

Tabela 1. Fatores de crescimento presentes no PRP associados à reprodução e seus efeitos sobre gametas e embriões.

| Fator de Crescimento | Tipo / Família | Locais de Ação | Funções Reprodutivas | Efeitos em Oócitos e Embriões | Efeitos em Espermatozoides | Mecanismos e Observações Relevantes |
|--|----------------|--|---|--|--|--|
| EGF (Epidermal Growth Factor) | Peptídeo | Útero; Óvário; Placenta; Testículo; Epididimo; Semên. | Maturação oocitária; capacitação espermática; Crescimento folicular; Implantação Produção de espermatozoides. | Maturação oocitária; clivagem; morfologia da zona; blastocisto; adesão celular. | Motilidade; capacitação; reação acrosomal; integridade de membrana. | Atua via receptor EGFR ativando vias MAPK (diferenciação celular/migração celular/proliferação celular). PI3K/Akt; (sobrevivência celular) STAT (transcrição) |
| IGF-I (Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I) | Polipeptídeo | Ovário; Útero; Testículo; Placenta. | Regula esteroidogênese, crescimento folicular; espermatogênese Mediador de GH Anti-apoptótico; Antioxidante. | Maturação oocitária; clivagem; blastocisto; proliferação celular acelerada; anti-apoptótico. | Motilidade; reduz peroxidação lipídica; protege DNA | Atua por receptores IGF-1R ativando PI3K/Akt (sobrevivência e inibição do apoptose) MAPK/ERK (proliferação e diferenciação celular) mTOR (síntese de proteína). |
| PDGF (Fator de crescimento derivado de plaquetas) | Polipeptídeo | Ovário; Útero; Testículo. | Angiogênese, reparo tecidual e remodelação celular Crescimento folicular e das células da granulosa. | Sinalizador autócrino na fase pré-implantacional. | Favorece metabolismo mitocondrial e integridade da membrana plasmática; Motilidade. | Atua por receptor (PDGFR); PI3K/Akt (sobrevivência e inibição do apoptose) MAPK/ERK (proliferação e diferenciação celular) fosfolipase C (PLC) e as proteínas quinases C (PKC) para sinalização |

| | | | | | | |
|---|---------------|---|---|--|---|---|
| TGF-β (Fator de crescimento transformador beta) | Polipeptideo | Ovário, Testículo, Útero placenta | Espermatogênese Foliculogênese | Maturação oocitária; regulador de crescimento celular; controla expressão de genes ligados à competência embrionária como o GDF-9 e o BMP-15; homeostase celular | Mantém estabilidade de membranas e reduz resposta inflamatória espermática | Atua via receptor TGFBR2 e SMADs; importante na qualidade do microambiente folicular Liga-se a proteínas quinases na superfície celular. |
| FGF2 (Fator de crescimento de fibroblasto 2) | Polipeptídeo | Ovário; Testículo; Útero; Placenta. | Foliculogênese; Espermatogênese; Receptividade endometrial; Antiapoptótico; mitogênico. | Maturação oocitária; Comunicação celular; Regulação de genes como os de pluripotência como NANOG e OCT4 | motilidade progressiva; e protege contra apoptose induzida por estresse oxidativo | Atua via receptor EGFR ativando vias MAPK (diferenciação celular/migração celular/proliferação celular) PI3K/Akt; (sobrevivência celular) |
| VEGF (Fator de crescimento do endotélio vascular) | Glicoproteína | Ovário; Testículo; placenta; Endométrio. | Vascularização; foliculogênese; angiogênese; Implantação do embrião. | Favorece viabilidade e metabolismo embrionário em cocultivo | Melhora integridade da membrana e resistência à criopreservação | Atua via VEGFR-; essencial para suporte trófico e oxigenação celular no ambiente reprodutivo. PI3K/Akt: (sobrevivência celular). MAPK/ERK (proliferação celular). PLC γ (permeabilidade vascular). FAK/paxilina (migração celular). |

A reprodução é um processo complexo influenciado por uma intrincada rede de mediadores biológicos. As plaquetas, além de sua função hemostática, emergem como importantes protagonistas na fisiologia reprodutiva (NAGY et al., 2023). Seu papel estende desde funções ovarianas, liberando diversos mediadores, como serotonina, histamina e fatores de crescimento, que influenciam diretamente a fisiologia ovariana (BODIS et al., 2014). Estão presentes no espessamento e receptividade endometrial liberando principalmente fator de crescimento derivado de plaquetas A (PDGFA) responsável pela receptividade do endométrio humano (NAGY et al., 2022). Além disso, quando ocorre a gravidez, a ativação controlada das plaquetas desempenha um papel na implantação, placentação, remodelação vascular placentária apropriada e manutenção da perfusão placentária (BODIS et al., 2014).

As plaquetas exercem funções além da coagulação, estando envolvidas em diversos processos patológicos. Por exemplo, na síndrome de hiperestimulação ovariana (OHSS). É uma doença iatrogênica séria, potencialmente fatal, causada por substâncias vasoativas liberadas por ovários superestimulados (NAGY et al., 2022). As plaquetas atuam liberando histamina, serotonina, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e ácido lisofosfatídico, que contribuem para a cascata fisiopatológica que leva à SHO (SIESS, 2002).

As plaquetas também estão envolvidas em processos inflamatórios e de coagulação associados a complicações gestacionais como a pré-eclâmpsia, a hipertensão gestacional, e a restrição de crescimento intrauterino (NAGY, 2023).

Por tanto, sendo um recurso autólogo, o PRP é inofensivo ao paciente, fácil de obter e de custo muito baixo (GONÇALVES et al., 2020). Que tem demonstrado, em diversos estudos, ser uma ferramenta eficaz na regeneração tecidual e cicatrização de feridas (COSTA et al., 2016). Além disso, o PRP tem sido explorado em tratamentos de fertilidade, podendo melhorar a qualidade dos óvulos e a receptividade endometrial (NAGY et al., 2023). A aplicação clínica do PRP tem se mostrado segura e eficaz, tornando-se uma opção promissora para o tratamento de diversas condições, com resultados que apontam para uma redução no tempo de recuperação e melhora na qualidade do tecido regenerado (COSTA et al., 2016).

Até o momento, não há trabalhos referentes ao uso de PRP como suplementação na etapa de fertilização *in vitro*, em bovinos e/ou outras espécies. Nesse contexto, o nosso trabalho vem perquirir os efeitos da adição de PRP em diferentes concentrações em meio de FIV.

2.5 EXPRESSÃO GÊNICA DE EMBRIÕES BOVINOS PRÉ-IMPLANTACIONAIS.

A avaliação molecular baseada na expressão de genes-chave envolvidos no desenvolvimento embrionário pré-implantacionais pode distinguir embriões com maior potencial de desenvolvimento daqueles com menor viabilidade. Sendo assim, o perfil da expressão gênica permite analisar a qualidade dos embriões oriundos da FIV, servindo como um selecionador para protocolos mais eficientes. Visando obter embriões com perfis de expressão gênica equivalentes aos produzidos *in vivo*, e assim melhorar as taxas de concepção (FUJII et al., 2024).

Neste trabalho, selecionamos cinco genes como biomarcadores de qualidade embrionária: OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4), IFNT (Interferon tau), HSP70 (Heat shock protein 70), SOD2 (Superoxide dismutase 2) e GLUT1 (Glucose transporter type 1). Suas funções serão abordadas em subitens subsequentes.

2.5.1 OCT 4/ POU5F1

O blastocisto mamífero passa por duas segregações de linhagem, isto é, formação do trofotoderma e subsequente diferenciação do hipoblasto (HB) da massa celular interna, o epiblasto (EPI). O OCT4 desempenha um papel fundamental na diferenciação das linhagens iniciais do embrião bovino, sendo essencial tanto para a manutenção da pluripotência do EPI quanto para a especificação e desenvolvimento do HB (SIMMET et al., 2022).

Sobre sua importância, já foi relatado, que em embriões de camundongos, a ausência de OCT4 impede a formação da MCI, resultando em falha na implantação do embrião (CHAZAUD et al., 2016). Diversos fatores de transcrição ocorrem desde o desenvolvimento embrionário, associados inclusive à reprogramação celular. Entre os fatores de transcrição testados e identificados como indutores à reprogramação celular, algumas combinações se destacaram, pela alta capacidade de proliferação e diferenciação celular. Logo, a reprogramação de células somáticas para um estado pluripotente pode ser alcançada a partir da expressão exógena de quatro fatores de transcrição em duas possíveis combinações: 1) SOX2, OCT4, KLF4 e C-MYC; 2) SOX2, OCT4, NANOG e LIN-28 (KIM, 2008; TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006).

A expressão de OCT4 em bovinos e suínos é diferente quando comparada à de camundongos. Nestas espécies, sua expressão não é restrita à MCI dos blastocistos, sendo observada também em células trofodermais. Um padrão similar de expressão também é observado em humanos e cabras (HE et al., 2006). Essas diferenças de distribuição de expressão

do gene OCT4 estão relacionadas com as particularidades que cada espécie possui durante o desenvolvimento embrionário (MEDVEDEV et al., 2008).

2.5.2 IFNT

Os interferons são uma família de proteínas que desempenham um papel crucial na resposta imune inata e adaptativa do organismo. Existem três principais tipos de interferons: Tipo I (IFN- α e IFN- β), Tipo II (IFN- γ) e Tipo III (IFN- λ). Cada tipo de interferon tem funções específicas, mas todos compartilham a capacidade de induzir a expressão de genes que contribuem para a defesa contra vírus e outros patógenos. (PESTKA, KRAUSE & WALTER., 2004).

O IFNT é um produto secretado em grandes quantidades pelas células do trofoblasto do concepto (embrião e anexos embrionários) de ruminantes antes da implantação (GRAY et al., 2002). O reconhecimento materno da gestação pode ser definido como o período em que o concepto sinaliza sua presença para a mãe. Em ruminantes, este período requer o alongamento do embrião, que coincide com a máxima produção de interferon-tau (IFNT). O IFNT liga-se a receptores de interferon tipo I (IFNAR1 e IFNAR2) com sinalização via Jak/STAT (BINELLI et al., 2001). Ao contrário de outros IFNs tipo I, a função do IFNT não está relacionada ao sistema imunológico. Em vez disso, ele sinaliza o estabelecimento e a manutenção da gestação. O gene do IFNT expresso pelo concepto dos ruminantes possui uma homologia de aproximadamente 70% com o Interferon-omega de humanos. Apresenta uma única região de leitura de 595 pares de bases, que codifica uma sequência primária (pré-proteína) de 195 aminoácidos, com uma região sinalizadora com 23 aminoácidos, que é clivada para formar a proteína de 172 aminoácidos (ROBERTS et al., 2019).

Além da sua ação durante o reconhecimento materno da gestação em ruminantes, o IFNT induz a expressão de vários genes estimulados por interferons (ISGs) no útero (MIRANDO et al., 1991). Bovinos, ovinos e caprinos também contêm inúmeras formas polimórficas de IFNT. Há evidências convincentes de que essas diferentes formas não têm atividades biológicas idênticas, incluindo suas habilidades de estender o comprimento do ciclo estral. Várias são as questões sobre a necessidade de tantas variantes de IFNT ainda permanecem sem resposta. (EALY & WOOLDRIDGE, 2017).

2.5.3 HSP70

As proteínas de choque térmico (HSPs) são parte evolutivamente integral do funcionamento de todas as células, atuando como chaperonas intracelulares que sustentam a proteostase celular em condições normais e em diversas condições de estresse como hipertermia, hipóxia, estresse oxidativo, radiação. (BELENICHEV, 2023).

As proteínas HSPs são consideradas conservadas, na qual sua resposta ao choque térmico é um sistema de defesa primitivo, presente em diversas células desde bactérias ao organismo humano. A função da chaperona da HSP70 é interagir com proteínas danificadas e desnaturadas, com subsequente determinação de sua fração (CLERICO et al., 2015). As proteínas de choque térmico (HSP) são reguladas positivamente precocemente em resposta a muitas agressões, incluindo o acidente vascular cerebral isquêmico. Essa regulação positiva permite que as células sobrevivam a condições potencialmente letais por meio de suas funções de chaperona, que podem auxiliar no enovelamento de proteínas nascentes e na prevenção da agregação proteica. A HSP induzível de 70 kDa, também conhecida como HSP70, provavelmente foi a mais extensivamente avaliada. Foi demonstrado que a HSP70 se correlaciona com o fenômeno da tolerância induzida. Estudos em modelos genéticos mutantes ou superexpressão usando transferência gênica ou estresse por calor mostraram ainda que a HSP70 levou a melhorias na sobrevivência das células cerebrais (KIM et al., 2019).

A ação da HSP70 leva à formação de termo tolerância, o fenômeno de adaptação a temperaturas elevadas e um aumento no limiar de temperatura de sensibilidade devido à estabilização de moléculas de proteína com HSP70 durante o aquecimento inicial menos intenso (RAMOS et al., 2017).

2.5.4 GLUT1

O GLUT1 (Glucose Transporter 1) codificado pelo gene *SLC2A1*, de transportadores facilitadores de glicose, que permitem a entrada passiva de glicose na célula. É uma proteína fundamental para o transporte de glicose em diversos tecidos do organismo, incluindo embriões em estágios iniciais de desenvolvimento. O GLUT1 possui alta afinidade por glicose e está envolvido no fornecimento de energia em condições em que a concentração de glicose é baixa. Foi o primeiro transportador de glicose a ser descrito e é responsável pelo transporte de glicose através da membrana plasmática (OLSO & PESSIN, 1996).

A via glicolítica tem suas especificidades em alguns tipos celulares como nas células beta e alfa, nas pancreáticas, nos hepatócitos, algumas células hipofisárias específicas e nos neurônios cerebrais. Nas células betas pancreáticas das ilhotas de Langerhans, o GLUT1 em conjunto com o GLUT2 funciona como transportadores transmembranar de glicose em humanos, para sustentar a captação suficiente de glicose pelas células beta, uma vez que há uma menor expressão do GLUT2 do que em roedores. (LENZEN, 2014).

O GLUT1 é um dos principais genes associados ao metabolismo de embriões produzidos *in vitro*, sendo detectado em estágios como clivagem e blastocisto. No desenvolvimento embrionário há um gasto energético intenso. Embriões com expressão constante de GLUT1 tendem a apresentar melhor desenvolvimento, sendo indicativo de viabilidade. Alterações na expressão de genes durante a fase de maturação oocitária podem ter influência sobre o desenvolvimento dos embriões. Um ambiente energético equilibrado é fundamental tanto para o crescimento folicular *in vivo* como para a maturação *in vitro* (MIV), uma vez que proteínas relacionadas ao metabolismo energético, como as transportadoras de glicose GLUT1 e as de monocarboxilatos (MCT-1 - *monocarboxylate transporter type 1*), têm influência em todos os estágios de desenvolvimento embrionário (DURANTI, 2011).

Um importante regulador do metabolismo da glicose é a via de sinalização da fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K). A sinalização da PI3K através da proteína quinase AKT pode aumentar a captação de glicose, aumentando a expressão do transportador de glicose GLUT1. Em células normais, a via PI3K é rigorosamente controlada para aumentar a captação e o metabolismo da glicose em resposta a sinais de crescimento (FONTANA et al., 2024). No entanto quando há uma inativação inadequada da PI3K, em um período de rápida proliferação celular e rápida biomassa como na embriogênese e na tumorigênese, gerando condições de hipóxicas locais, em resposta adaptativa é ativado um importante fator regulador : o HIF-1 (fator transcricional induzível por hipóxia), ele vai então estimular o aumento da transcrição de genes relacionados metabolismo glicolítico, assim como enzimas glicolíticas e fatores de crescimento angiogênicos e hematopoiéticos. (LUNTS, 2011). O HIF-1 é necessário para a embriogênese, pois em condições de hipóxia a proliferação celular e sobrevivência celular aumentam devido a fatores regulados pelo HIF-1, o fator de IGF-2 (fator de crescimento da insulina-2) e TGF α (fator de crescimento transformador). (FELDSER, 1999).

2.5.5 SOD2

Quando ocorre um desequilíbrio na homeostasia do organismo, há uma superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROS). Esse aumento de EROS exige do organismo um aumento na atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) plasmáticas e teciduais, na tentativa de combater o dano oxidativo. (SULZBACHER, 2020).

A superóxido Dismutase 2 (SOD2), também conhecida como MnSOD (Superóxido Dismutase de Manganês), é uma das três isoformas da enzima Superóxido Dismutase encontradas em mamíferos. A SOD2 requer metal catalítico, especificamente Manganês (Mn), para sua ativação. Sua função principal é catalisar a conversão do ânion superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Esta reação é fundamental como um dos principais sistemas de defesa antioxidante contra o ROS (FUKAI et al., 2011).

Em um estudo conduzido por Rizos et al (2002), relataram que o SOD2 é um marcador potencial da atividade mitocondrial, observando que quanto melhor a qualidade mitocondrial, menor a produção de ROS. E que a expressão de SOD2 pode ser interpretada como a competência embrionária frente a defesa contra o estresse oxidativo.

3. HIPOTESE

O uso de PRP na etapa de fecundação melhora a qualidade e a quantidade dos embriões bovinos produzidos *in vitro*.

4. OBJETIVOS

4.1 GERAL

Avaliar os efeitos da adição de diferentes concentrações de plasma rico em plaquetas (PRP) no meio de fecundação e seu efeito na qualidade e quantidade de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

4.2 ESPECÍFICOS

- a) Avaliar as taxas de clivagem e formação de blastocisto com diferentes concentrações de PRP (0, 2,5, 5 e 10%) durante a fecundação *in vitro* de oócitos bovinos.
- b) Determinar a melhor concentração de PRP para adicionar ao meio de fecundação *in vitro*.
- c) Avaliar a qualidade embrionário após fecundação na presença de PRP pela expressão dos genes OCT4, IFNT, HSP70, SOD2 e GLUT1 em blastocistos eclodidos no dia 8 de cultivo.

5. METODOLOGIA

5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Neste experimento, CCOs bovinos foram selecionados, maturados, e na etapa da fecundação, foram distribuídos em quatro grupos experimentais, de acordo com a adição de Plasma rico em plaquetas (PRP) ao meio de FIV: controle (sem PRP), grupo com 2,5%, grupo 5% e grupo 10% de PRP respectivamente, conforme ilustrado na Figura 5.

As taxas de clivagem e de formação de blastocistos foram avaliadas nos dias 2 e 7 do desenvolvimento embrionário, respectivamente. Também foi avaliada qualidade dos embriões produzidos a partir da análise de expressão gênica de alguns marcadores genéticos de qualidade.

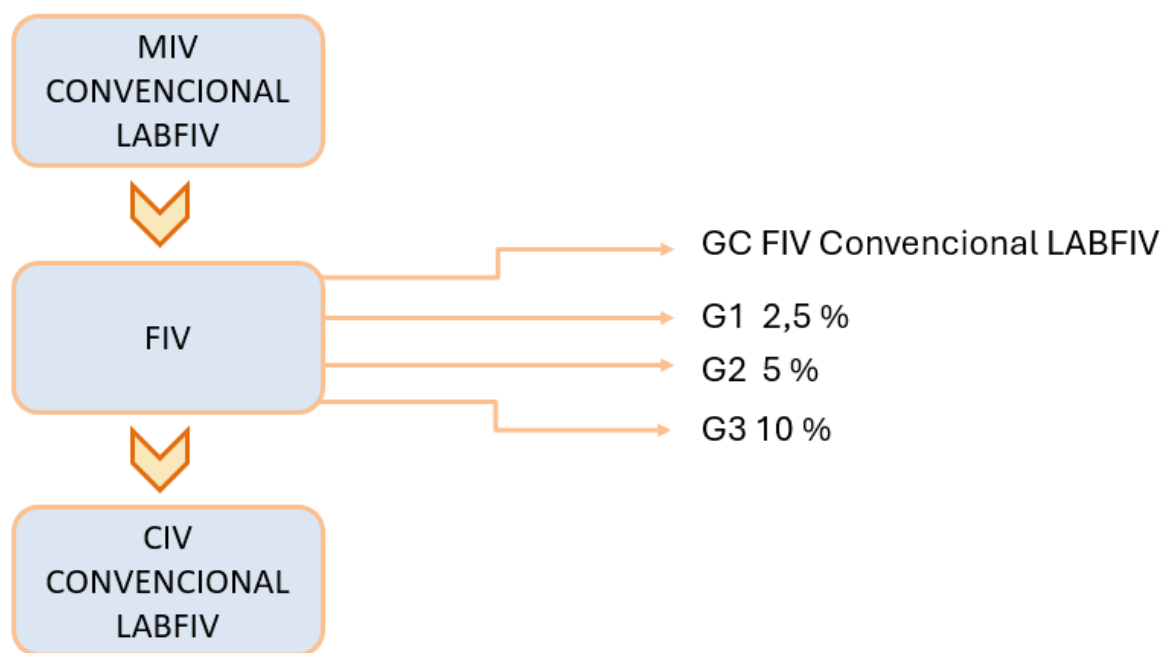


Figura 5: Fluxograma experimental. MIV: maturação *in vitro*; FIV: fertilização *in vitro*; CIV: cultivo *in vitro*. G1,G2 e G3 descrevendo as concentrações de plasma rico em plaquetas.

5.2 PRODUÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS

O protocolo de obtenção do PRP foi adaptado de Marques et al. (2014). Para tanto, o sangue foi coletado de vacas adultas no momento do abate e depositado em tubos de coleta estéreis pulverizados com heparina e transportado em gelo até o laboratório para processamento. Então, as amostras foram centrifugadas a 640 g durante 25 minutos a temperatura ambiente para separação dos componentes sanguíneos. Após a centrifugação o

plasma sobrenadante foi dividido em duas frações de mesmo volume, fração plasmática superior – FPS (50% do plasma mais superior) e fração plasmática inferior – FPI (50% do plasma mais próximo à capa leucocitária). A FPI foi mantida e a FPS foi descartada. A FPI foi transferida para um outro tubo Falcon com pipeta Pasteur e novamente centrifugada, agora a 120 g por 10 minutos. Então, 75% do plasma sobrenadante superior (considerado pobre em plaquetas - PPP) foi descartado sendo conservado apenas 25% da fração inferior considerado PRP, que foi aliquoteado e congelado até o momento do uso (Figura 6).

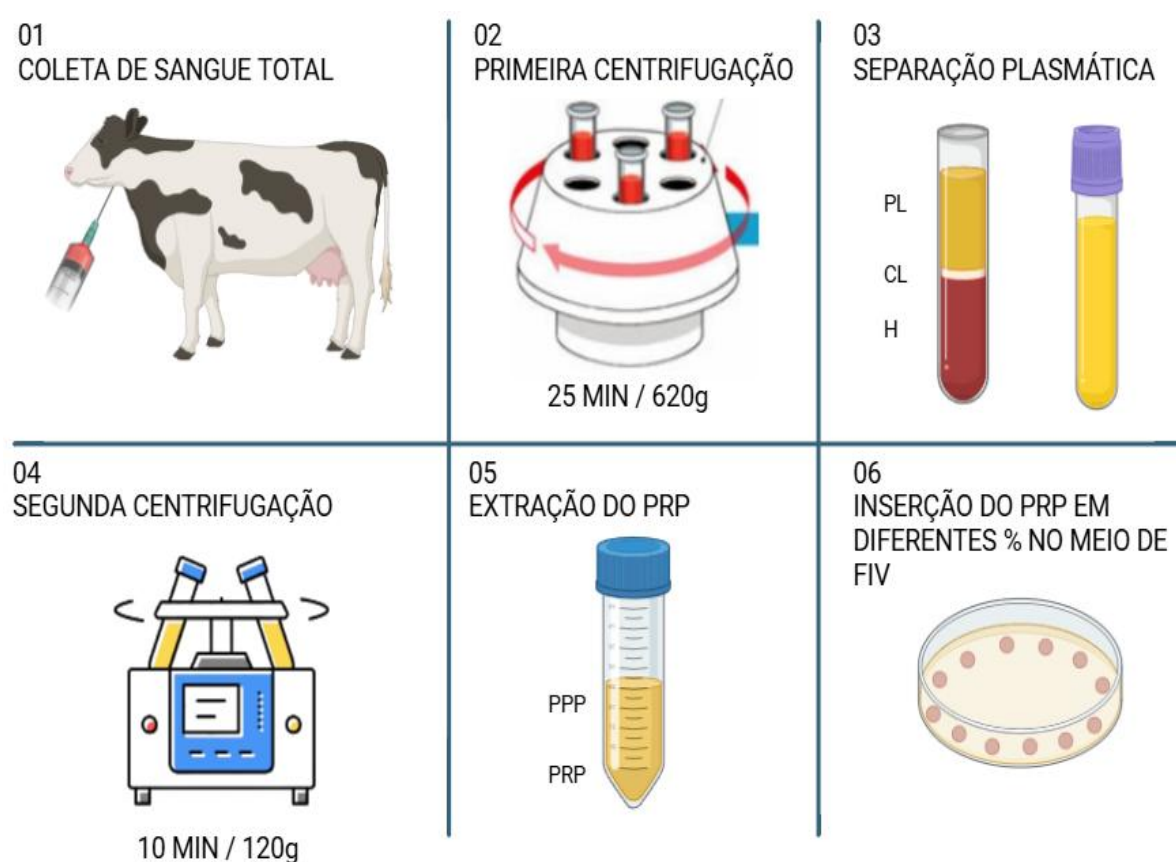


Figura 6: Descrição do processamento do sangue para obtenção do PRP, adaptado de Marques et al. (2014). PT: plasma total; CL: camada leucocitária; H: hemácias.F PPP: plasma pobre em plaquetas; PRP: plasma rico em plaquetas.

5.3 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

5.3.1 Obtenção dos Ovários

Os ovários foram obtidos em abatedouro frigorífico local. Os ovários coletados logo após o abate, lavados em PBS e acondicionados em frasco com solução salina (0,9% cloreto de sódio) à temperatura de 30 a 35°C sendo transportados até o laboratório de Fertilização *in Vitro* do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará dentro de um período máximo de 2 horas para a realização da punção folicular.

5.3.2 Recuperação e Seleção dos CCOs

Os Ovários utilizados neste experimento foram de vacas *post-mortem*, oriundos de abatedouro frigorífico de uma cooperativa da indústria pecuária local com devida autorização prévia. Os CCOs foram obtidos pelo método de aspiração folicular, no qual os folículos antrais com diâmetro de 2 a 8 mm foram puncionados utilizando-se agulhas 18G x 1½ acopladas em seringas de 10 mL, sendo o fluido folicular depositado em tubos de 15 mL. Terminada a aspiração, os tubos foram centrifugados por 5 segundos de forma que haja a separação do sobrenadante e do pellet onde se encontram os CCOs. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento transferido para uma placa de Petri estéril de poliestireno de 60 mm de diâmetro contendo meio de lavagem TL-HEPES. O rastreamento dos oócitos realizado sob estereomicroscópio em uma cabine de fluxo laminar, por critérios morfológicos, selecionando apenas CCOs com citoplasma homogêneo, de coloração levemente marrom, com 3 ou mais camadas compactas das células do *cumulus* ao redor do ócito, com a zona pelúcida sem deformações e *cumulus* íntegro, classificados como mais viáveis segundo Gonçalves et al. (2008).

5.3.3 Maturação *In Vitro* (MIV)

Os CCOs lavados e selecionados após o rastreio foram incubados em placas de Petri com gotas de 100 µL (10 a 12 CCOs por gota) sub óleo mineral estéril, em meio de MIV (Meio 199 suplementado com 10% de SFB, 0,5 µg/mL de FSH, 5 UI/mL de hCG, 22 µg/mL de piruvato, 6 mg/mL de BSA e 50 µg/mL de gentamicina). Foram mantidos em estufa de cultivo com 5% de CO₂, 20% de O₂ e 75% de N₂ sob atmosfera úmida e temperatura de 38,5°C por um período de 18-20 horas.

5.3.4 Fecundação *In Vitro* (FIV)

Para a FIV foi utilizado sêmen criopreservado de um único touro (*Bos taurus indicus*) mantido em botijões com nitrogênio líquido. A palheta de sêmen foi descongelada em banho maria a 37°C por 30 segundos. o sêmen foi depositado sobre coluna de gradiente descontínuo (90% e 45%) de Percoll (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden) e submetido à centrifugação (600 g) por 7 minutos. Em seguida o pellet formado pelos espermatozóides vivos foi lavado em meio *Tyrode's albumin lactate pyruvate* (TALP) segundo protocolo de Parrish *et al.*, (1988), acrescido de 6 mg/mL de BSA, 2 µM de penicilamina, 1 µM de hipotaurina, 0,25 µM de epinefrina, 10 µg/mL de Heparina, 22 µg/mL de piruvato e 50 µg/mL de gentamicina, mediante centrifugação por 3 minutos a 600 g.

Após o período de MIV, os 20 CCOs foram distribuídos e co-incubados com os espermatozoides em gotas de 100 µL de meio TALP (suplementado com antibióticos, heparina, hipotaurina, epinefrina e BSA) e diferentes concentrações de PRP, descrito anteriormente, durante 24 horas sob as mesmas condições de incubação da MIV

5.3.5 Cultivo *In Vitro* (CIV)

Para propiciar o desenvolvimento embrionário, os embriões foram cultivados em sistema de co-cultivo sobre monocamada de células do *cumulus oophorus*, previamente aderidas à placa durante a maturação *in vitro* (MIV).

Para isso a placa pós MIV teve seu meio substituído por 100µL de *Synthetic Oviductal Fluid*, segundo Holm *et al.*, (1999), suplementado com 10% de SFB, 1 mM de glicose, 6 mg/mL de BSA, 80 µg/mL de piruvato e 50 µg/mL de gentamicina. Nessas condições permaneceram na incubadora até o momento da transferência dos embriões. Os prováveis zigotos foram submetidos a sucessivas pipetagens para remoção das células do *cumulus oophorus* e transferidos para as gotas de cultivo, de acordo com os grupos experimentais citados no delineamento, onde permanecerão por 7 dias sob as mesmas condições de cultivo citadas para a MIV e FIV.

5.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

5.4.1 Coleta e Armazenamento das Amostras

Os embriões expandidos (5 embriões por *pool*) foram armazenados em tubos de microcentrifuga contendo 10 µL de RNAlater® (Applied Biosystems, Foster, CA) e mantidos em freezer de -20°C até seu uso.

Para o armazenamento os embriões foram submetidos a lavagens em tampão fosfato-salino (PBS) com 0,01% de álcool polivinílico (PVA). Após estas lavagens, os blastocistos foram separados em grupos de 5, de acordo com as suas classificações de estágio de desenvolvimento embrionário e depois transferidos para microtubos com 10 µL de RNA later® e armazenados em freezer a -20°C.

5.4.2 Extração de RNA e Amplificação dos Genes

A extração do RNA foi realizada utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen RNA, Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Logo em seguida, o RNA foi submetido à transcrição reversa para obtenção do cDNA, empregando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), conforme o protocolo do fabricante. Após a reação, as amostras de cDNA foram armazenadas a -20°C para análises moleculares subsequentes.

Tabela 2: Dados dos genes selecionados para PCR de tempo real

| Gene | Atividade | Sequência | Código no GeneBank |
|-------------------|----------------------------------|---|--------------------|
| OCT4 (POU5F1) | Manutenção de totipotência | F: GGTGTTTCAGCCAAACGACTATC R: TCTCTGCCTTGCATATCTCCTG | NC_037350.1 |
| HSP70 | Proteção contra estresse térmico | F: TCACGTCGTTGATCCTGTGG R: ATGATCTCCACCTTGCCGTG | NM_203322.3 |
| GLUT1 (SLC2A1) | Transporte de glucose | F: CTGCTCATTAACCGCAACGA R: TGACCTTCTTCTCCCGCATC | NM_174602.2 |
| IFNT | Sinalização materno-embriônica | F: GAAGAGGTTGAGGCACTGCT R: TCCTCAGGAGATGGTGGAGG | NC_037335.1 |
| SOD2 | Defesa antioxidante mitocondrial | F: GGATCCCCTGCAAGGAACAA R: TGGCCTTCAGATAATCGGGC | NM_201527.2 |
| GAPDH | Controle endógeno | F: CTCAACGGGAAGCTCACTG R: CTCTGATGCCTGCTTCACCA | NM_001034034.2 |
| ACTB | Controle endógeno | F: CACAGGCCTCTCGCCTTC R: ATCATCCATGGCGAACTGGT | NM_173979.3 |

F: Reverse (reverso), refere-se ao primer reverso ou a sequência de fita complementar (sentido 3' → 5').

R: Forward (direito), refere-se ao primer direito ou a sequência da fita codificante (sentido 5' → 3').

A amplificação dos genes foi realizada por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (q-PCR) com auxílio do software StepOne Real Time PCR System (Applied Biosystems) e o kit comercial SYBR Green® PCR Master Mix (Applied Biosystems). Os *primers* utilizados estão descritos na Tabela 2. As condições de termociclagem do experimento foram: 95°C por 10 minutos e, 45 ciclos de amplificação a 95°C por 15s e 60°C por 1 min. Nestas curvas os genes GAPDH e ACTB foram amplificados como controles endógenos. A análise da expressão gênica foi realizada utilizando o método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (DA COSTA et al., 2016b). Foram conduzidas 3 repetições com 5 blastocistos eclodidos em cada grupo por repetição.

Devido à baixa produção embrionária observada no grupo tratado com 10% de PRP, o que compromete as taxas de embriões e qualidade do material, optou-se por não incluir esse grupo na análise de expressão gênica. Embriões com baixa viabilidade, refletida nas menores taxas de clivagem e blastulação, tendem a apresentar um perfil molecular associado ao estresse celular e à apoptose, caracterizando um estado conhecido como senescência celular, no qual o embrião permanece metabolicamente ativo, porém, em decorrência de um ambiente altamente estressor e com níveis elevados de espécies reativas de oxigênio, entra em parada permanente do ciclo celular (Ramos-Ibeas et al., 2020).

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o programa SigmaPlot® versão 14.0 (Systat Software Inc.). Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov seguido de análises de variância (*one-way* ANOVA), com o pós-teste de Tukey sendo utilizado entre as médias que apresentaram diferenças. O nível de significância considerado em todas as análises foi de 5% ($p < 0,05$).

6. RESULTADOS

6.1 TAXAS DE CLIVAGENS E DE FORMAÇÃO DE BLASTOCISTOS

No total, foram utilizados 594 CCOs distribuídos entre os grupos experimentais, com o objetivo de avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de PRP ao meio de FIV sobre o desenvolvimento embrionário. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3, demonstrando as taxas de clivagem (D2) e de formação de blastocistos (D7) para cada grupo experimental.

Tabela 3. Taxas de clivagem e blastocistos nos grupos suplementados com diferentes concentrações de PRP durante o processo de fecundação.

| Grupos experimentais | n (CCO) | Clivagens D2 (%) | Blastocistos D7 (%) |
|-----------------------------|----------------|-------------------------|----------------------------|
| Controle | 181 | 91.9 ± 3,9 ^a | 44.6 ± 9.0 ^a |
| 2,5 % PRP | 141 | 87.9 ± 6.4 ^a | 39.0 ± 14.1 ^a |
| 5% PRP | 142 | 85.8 ± 7.4 ^a | 35.1 ± 11.4 ^a |
| 10% PRP | 130 | 61.1 ± 9.9 ^b | 17.6 ± 4.9 ^b |

n= número amostral. Dados são expressos como média ± desvio padrão. ^{a,b} Subscritos diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.

Observou-se que o grupo controle apresentou as maiores taxas de clivagem (91,9±3,9%) e de blastocisto (44,6±9,0%), diferindo significativamente ($p < 0,05$) do grupo tratado com 10% de PRP, no qual os valores foram acentuadamente inferiores (61,1 ± 9,9% e 17,6 ± 4,9%, respectivamente). As concentrações de 2,5% e 5% de PRP não diferiram estatisticamente do controle ($p > 0,05$), indicando que níveis moderados de PRP não comprometeram o desenvolvimento inicial dos embriões *in vitro*. Esses resultados sugerem que a resposta ao PRP é dependente da concentração, e que níveis elevados podem exercer efeito inibitório sobre a clivagem e o avanço ao estágio de blastocisto.

Os resultados obtidos neste experimento evidenciaram alterações morfológicas nas células do *cumulus* após 24 horas de exposição dos presumíveis zigotos ao meio de fecundação suplementado com PRP, independentemente da concentração utilizada como demonstra a figura 7. Durante a reação acrossômica, enzimas espermáticas, como hialuronidase e acrosina, degradam o ácido hialurônico, um dos principais componentes da matriz extracelular que mantém a coesão entre as células do *cumulus* e da corona radiata, promovendo a dispersão dessas células (SEOL et al., 2022). Dessa forma, é esperado que ocorra redução da adesão celular, desprendimento da matriz extracelular e dispersão das células do *cumulus* ao longo do tempo.

Nos grupos suplementados com PRP, entretanto, esses efeitos foram menos pronunciados, observando a formação evidente de adesão celular na placa lembrando uma monocamada. Essa resposta pode estar relacionada à ação dos fatores de crescimento presentes no PRP, que possivelmente atenuaram o estresse oxidativo e contribuíram para a manutenção parcial da integridade da matriz extracelular.

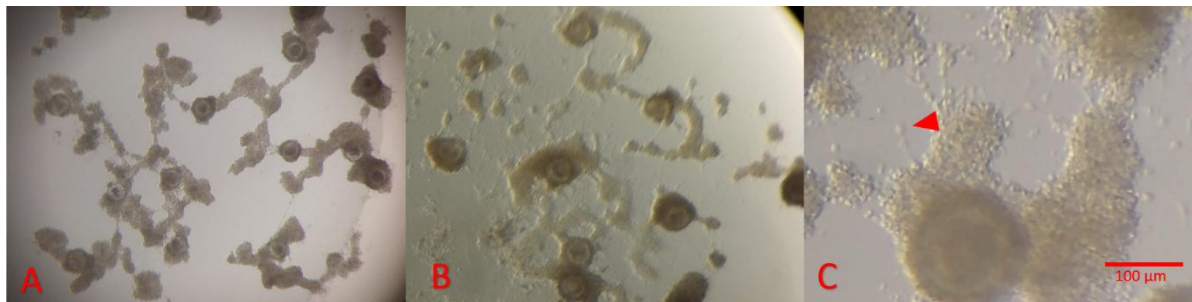


Figura 7 – Aspecto macroscópico do meio de fecundação suplementado com plasma rico em plaquetas (PRP) ao longo de 24 horas de interação com os gametas, em condições controladas de incubação a 38,5 °C, 5 % de CO₂ e 20% O₂. A- Grupo controle. Observa-se que as células do *cumulus* se tornam dispersas, retraídas. B- Grupo PRP 5%. Observa-se que as células do *cumulus* exibiram preservação estrutural mais evidente, mantendo adesão celular e integridade morfológica superiores às observadas no grupo controle. C-Imagem ampliada demonstrando aumento da adesão celular e formação de uma monocamada.

6.2. EXPRESSÃO GÊNICA

A análise da expressão gênica revelou que os níveis transcricionais variaram de acordo com as concentrações de PRP adicionadas ao meio de FIV (Figura 8). Observou-se aumento significativo ($p < 0,05$) na expressão dos genes OCT4, IFNT e HSP70 nos grupos suplementados com 5% de PRP, quando comparados ao grupo controle.

O gene OCT4, marcador de pluripotência embrionária, apresentou maior expressão no grupo tratado com 5% de PRP, tanto em relação ao controle e o 2,5%.

De forma semelhante, o gene IFNT, responsável pela sinalização materno-embrionária inicial e para o reconhecimento da gestação, apresentou ampliação expressiva no grupo 5%, indicando melhor sinalização para adaptação do embrião ao ambiente uterino e a manutenção do corpo lúteo, aumentando as chances de sucesso na implantação e manutenção da prenhez (ANTONIAZZI, AMARAL e BRID, 2019). A expressão aumentada de HSP70, uma proteína associada à resposta ao estresse celular, também foi evidente no grupo de 5%.

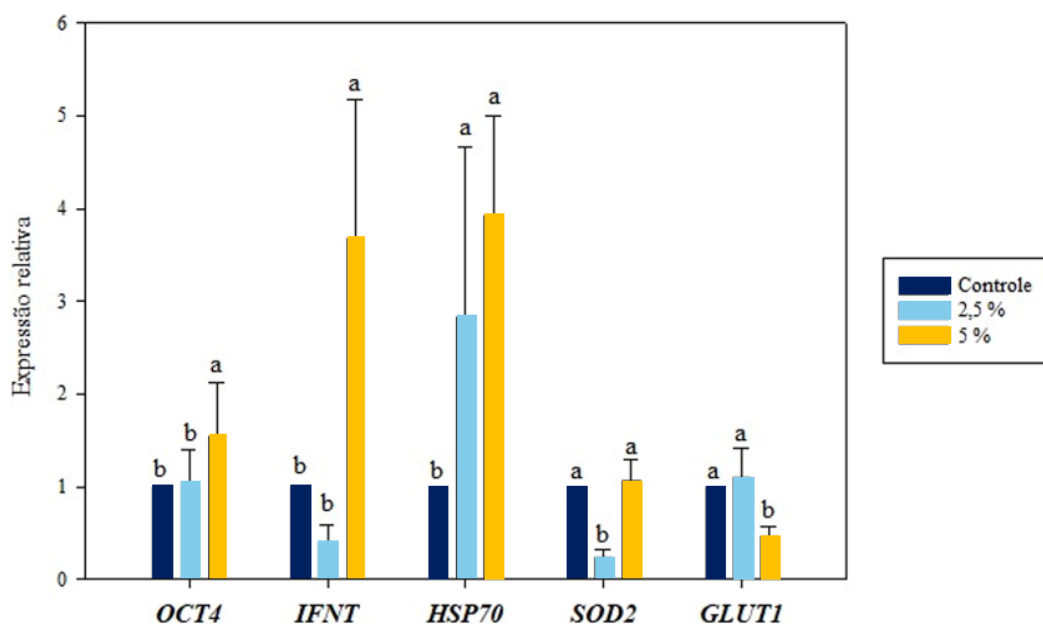


Figura 8: Expressão gênica dos embriões fecundados com PRP ($p < 0,05$).

Por outro lado, o gene SOD2, relacionado ao metabolismo oxidativo não apresentou diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p > 0,05$). No entanto, houve uma redução da expressão observada no grupo tratado com PRP 2,5%. Essa estabilidade entre o controle e o grupo 5% indica não alterou de forma adversa o equilíbrio redox durante a incubação. A menor expressão de SOD2 pode estar associada com a eficiência da atividade de HSP70, uma vez que há evidências que o Hsp70 inibe a expressão de NOX1, reduzindo a produção de ROS mitocondrial (LI et al., 2018).

Por fim, na avaliação do metabolismo energético, observou-se que a expressão relativa do gene GLUT1 apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais. O GC manteve níveis mais elevados de expressão de GLUT1, semelhantes ao grupo tratado com 2,5% de PRP, enquanto o grupo tratado com 5% de PRP apresentou uma redução significativa na expressão desse gene.

Em síntese, o perfil de expressão gênica do grupo tratado com PRP 5% indica um efeito benéfico do PRP sobre a qualidade e viabilidade embrionária.

7. DISCUSSÃO

Neste estudo, avaliamos o impacto do enriquecimento do meio de fertilização *in vitro* com PRP, utilizado como suplemento bioativo, sobre a eficiência da produção de embriões bovinos. Os resultados indicaram que o PRP pode ser incorporado ao meio de fecundação, desde que respeitadas concentrações adequadas.

Em conformidade com os resultados reportados neste estudo, Marini et al. (2016) avaliaram o impacto de diferentes concentrações de PRP (5% e 10%) em meio de cultura na proliferação de células endometriais bovinas *in vitro* e na expressão de genes relacionados à regulação do ciclo estral e à interação materno-fetal. Nesse estudo, a concentração de 5% de PRP estimulou de forma significativa a proliferação celular, enquanto a de 10% reduziu a taxa de crescimento. Resultados consistentes foram também relatados por Pazoki et al. (2016), que, ao investigarem o uso de Plasma lisado como promotor de maturação em camundongos, observaram taxas significativamente maiores na concentração de 5%, enquanto a maturação em meio suplementado com 10% foi significativamente reduzida. Em conjunto, esses achados sugerem que concentrações mais elevadas de PRP podem exercer um efeito inibitório, possivelmente devido ao excesso de fatores de crescimento (Marini et al., 2016).

Souza et al. (2024) relataram que a adição de 5% de PRP ao meio de maturação, associada ou não ao soro fetal bovino, atende às demandas bioquímicas do oócito, promovendo maturação eficiente em comparação ao grupo sem suplementação, destacando que nessa concentração o PRP pode substituir satisfatoriamente o soro fetal bovino nesta etapa. A concentração de 5% de PRP no meio de FIV também atendeu às demandas dos gametas tanto quanto o grupo controle.

Em contraste, Ramos-Deus et al. (2020), ao avaliarem a adição de PRP durante a MIV e CIV de presumíveis zigotos bovinos, relataram aumento significativo nas taxas de blastocisto no grupo suplementado com 5%, em comparação ao controle, esse resultado difere do observado em nosso estudo. Entretanto, quando a concentração de PRP utilizada foi de 10%, os autores verificaram redução no número de blastocistos e blastômeros, achado semelhante ao que constatamos ao testar essa mesma concentração. Esses resultados, em conjunto, indicam que a concentração de 10% de PRP é inviável para as etapas de MIV, FIV e CIV para bovinos.

Embora diversos fatores possam ter influenciado os resultados obtidos, é relevante destacar uma tendência consistente de redução nas taxas de clivagem nos grupos expostos à concentração de 10% de PRP, o que merece atenção na interpretação dos dados. Essa redução das taxas seja recorrente entre os experimentos, pode estar relacionada à composição

bioquímica do PRP, especialmente quanto ao seu conteúdo lipídico. De acordo com Ramos-Deus et al. (2020), a concentração média de lipídios no PRP ($164,0 \pm 64,3a$ mg/mL) é significativamente superior à observada no soro SFB ($30,8 \pm 2,7b$ mg/mL), apresentando níveis cinco vezes maiores.

Concentrações elevadas de lipídios no meio de cultivo podem desencadear lipotoxicidade, uma condição celular adversa caracterizada pelo acúmulo de lipídios no citoplasma, disfunção mitocondrial e indução de estresse oxidativo (MEULDERS et al., 2025). No contexto oocitário, esse processo leva à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), peroxidação lipídica, fragmentação do DNA e ativação de vias apoptóticas, comprometendo a integridade estrutural e funcional da célula (MAREI et al., 2019).

O excesso de lipídios no meio pode reagir com as espécies reativas de oxigênio, exacerbando o estresse oxidativo. Esse processo prejudica o espermatozoide e interfere negativamente nas taxas de fecundação (MARQUES et al., 2023). Além disso, a elevada concentração de lipídios pode comprometer a fluidez da membrana plasmática do espermatozoide, prejudicando a capacitação adequada e, conseqüentemente, a capacidade de fecundação (BOZZI, 2025).

A concentração de PRP adicionado ao diluente de crio-preservação teve efeito sobre a qualidade espermática pós- descongelação. Estudos em búfalos, bodes e humanos demonstraram dose-efeito com a melhora da motilidade, da integridade funcional da membrana, da integridade do DNA, da motilidade progressiva e viabilidade, associadas a presença de FC como FGF, PDGF e IGF, relacionados à melhora da motilidade espermática, capacitação e também à redução do estresse oxidativo. Entretanto, concentrações elevadas podem aumentar a viscosidade do meio, a osmolaridade, reduzindo o efeito antioxidante e protetor observados em doses ótimas (ALMADALY et al., 2023; ALCAY et al., 2021; YAN et al., 2021).

Considerando que os estudos com o uso de PRP em biotecnias de reprodução assistida ainda são muito recentes, não existem estudos que quantifiquem os tipos de lipídios presentes no PRP, o que seria decisivo para uma compreensão abrangente. Contudo, foi estudado que o PRP contém concentrações significativas de fosfolipídios, colesterol e ácidos graxos (BIRÓ et al., 2005). Assim, o aumento do contato com lipídios no meio de fecundação pode ter causado alterações na estrutura e fluidez da membrana dos espermatozóides, resultando na diminuição da capacidade de fecundação observada no grupo de tratamento com 10% de PRP.

Com base nos nossos resultados, não é possível determinar as causas específicas que levaram à redução da taxa de clivagem no grupo com 10% de PRP. No entanto o excesso de

fatores de crescimento e o aumento de lipídios no meio, podem ser os fatores centrais. Essas lacunas devem ser alvo de estudos futuros para aprimorar o uso de PRP na PIVE.

Ainda sobre as taxas de clivagem, a análise dos nossos resultados contrasta com os achados por Alae et al. (2024) que relataram taxas de clivagem significativamente maiores após a adição de 5% de PRP no meio de maturação de oócitos de camundongos, enquanto que no nosso trabalho não houve diferença significativa na taxa de clivagem entre o grupo controle e os grupos tratados com 2,5% e 5% de PRP como já citado acima. Tal divergência pode ser atribuída, em parte, às diferenças metodológicas, como a etapa de adição do meio e, principalmente, à distinta técnica de obtenção do PRP, que no nosso estudo seguiu um modelo padronizado especificamente para bovinos.

Entendendo a necessidade de avaliar qualitativamente os embriões produzidos sob efeito do PRP na FIV, optamos pela análise de genes relacionados à competência embrionária. e observamos um aumento significativo da expressão gênica de OCT4, IFNT, HSP70 e SOD2, indicando, respectivamente, maior pluripotência, sinalização materno-fetal, proteção contra danos celulares e redução do estresse oxidativo nos embriões do grupo suplementado com 5% de PRP. Indicativamente, os grupos de embriões tratados com PRP (2,5% e 5%) apresentaram aumento na expressão de HSP70, refletindo uma melhor resposta ao estresse celular, os resultados observados na expressão de HSP70 nos grupos suplementados com PRP corroboram com os dados obtidos de Souza et al. (2024) que obtiveram resultados semelhantes, ao comprovar uma maior expressão do gene HSP70 em todos os grupos que incluíam o PRP.

Enquanto a ação do PRP em cada gene analisado, o OCT4 é um gene essencial para a manutenção da pluripotência e da autorrenovação celular, sendo predominantemente expresso no ICM dos blastocistos. Sua expressão equilibrada é considerada um marcador de embriões de alta qualidade, associada à capacidade de diferenciação adequada e à viabilidade embrionária. Condições de cultivo mais estáveis, com menor estresse oxidativo e melhor suporte metabólico, favorecem a preservação da expressão de OCT4 (KANG et al., 2014). Em concordância com esses achados, nossos resultados indicaram bom desempenho de OCT4 na presença de PRP, sugerindo que o uso desse recurso pode auxiliar na manutenção da pluripotência, aumentando o potencial de implantação e desenvolvimento embrionário.

Segundo Souza et al. (2024), a adição de PRP durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos está relacionada ao aumento da expressão de HSP70 conferindo maior proteção celular contra o estresse. A expressão de HSP70, regulada pelo PRP de forma comparável ao FBS, sugere que o PRP contribui para a manutenção de um ambiente favorável à expressão de genes

sensíveis, como OCT4 e IFNT. Além disso, HSP70 pode modular a expressão de genes antioxidantes, incluindo SOD2, G6PD e GPX1, auxiliando na redução da produção de espécies reativas de oxigênio (STAMPERNA et al., 2021). Esses mecanismos reforçam o papel do PRP como modulador da resposta antioxidante e protetor da qualidade embrionária.

O IFNT é o principal sinal de reconhecimento materno da gestação em ruminantes, sendo secretado pelos trofoblastos nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário. Sua elevada expressão está associada a embriões de alta qualidade, maior capacidade de implantação e manutenção da gestação (FORDE & LONERGAN, 2017). O PRP pode melhorar o ambiente no cultivo *in vitro* ao reduzir o estresse celular por meio da expressão de HSP70 e SOD2, favorecendo IFNT, uma vez que o excesso de estresse oxidativo compromete a regulação desse gene (AMARAL et al., 2020).

A dinâmica do ambiente *in vivo*, onde a concentração de carboidratos varia de forma estratégica entre as estruturas da tuba uterina para atender às necessidades celulares (RODRÍGUEZ-ALONSO et al., 2020), contrasta com a disponibilidade metabólica do cultivo *in vitro*. Nesse contexto, a avaliação dos efeitos do PRP sobre o metabolismo de carboidratos através da expressão de GLUT1 revelou que a adição de PRP impacta a regulação do metabolismo energético de maneira dose-dependente. A dose de 5%, resultou em uma redução significativa, sugerindo que o embrião é viável e saudável, tendo suas necessidades nutricionais supridas adequadamente.

É pertinente discutir a teoria do “metabolismo silencioso” proposta por Leese (2002), na qual defende que embriões de boa qualidade mantem uma baixa taxa metabólica, semelhante ao embrião *in vivo*, que utilizam uma concentração menor de substratos energéticos. Assim, analisar o consumo e produção de substratos energéticos como glicose, piruvato, lipídios e aminoácidos pode ser um parâmetro para a qualidade embrionária estabelecendo uma correlação com viabilidade de implantação (SCOTT, ZHANG & SELI., 2018). De forma contundente, revisões mais recentes sobre essa teoria esclarecem que a qualidade embrionária não se resume a um metabolismo “quieto” ou “ativo”, mas sim à existência de uma zona ótima de atividade metabólica, na qual o embrião obtém a energia necessária para sustentar seu desenvolvimento (LEESE, BRISON & STURMEY., 2022). Sob essa perspectiva, a redução da expressão do transportador GLUT1 pode ser interpretada como um indicativo de que embriões de boa qualidade atingiram um consumo energético eficiente durante o cultivo *in vitro*, refletindo uma adequada utilização dos recursos metabólicos disponíveis.

Dessa forma, a utilização de PRP em concentrações otimizadas, especialmente em torno de 5%, contribui para a expressão de genes essenciais e para a manutenção da qualidade embrionária, favorecendo o processo de desenvolvimento.

8. CONCLUSÕES

A adição de PRP ao meio de fecundação *in vitro* depende da concentração;

Concentrações de até 5% de PRP suplementado ao meio de FIV não interferem nas taxas de clivagem e formação de blastocistos, enquanto a concentração de 10% prejudica o desenvolvimento embrionário;

A adição de 5% de PRP ao meio de FIV induziu uma regulação expressiva do gene HSP70. Essa resposta ao estresse celular foi associada à expressão adequada e compensatória dos genes OCT4, IFNT, SOD2 e GLUT1 resultando em embriões com maior competência embrionária pré-implantacional.

REFERÊNCIAS

- ABD EL-AZIZ, A. H. et al. Factors influencing *in vitro* production of bovine embryos: A review. ***Asian Journal of Animal and Veterinary Advances***, v. 11, n. 12, p. 737–756, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3923/ajava.2016.737.756>>. Acesso em: 20 jun. 2025.
- ALAE S, Zal F, Razban V, Talaei-Khozani T, Shokri S, Khodabandeh Z. PRP Influences Maturation and Fertilisation of Immature Mouse Oocytes. *Anat Histol Embryol*. 2024 Nov;53(6):e13112. doi: 10.1111/ahe.13112. PMID: 39396107.
- ALMADALY EA, Ibrahim IM, Salama MS, Ashour MA, Sahwan FM, El-Kon II, Abouzed TK, El-Domany WB. Effect of platelet-rich plasma (PRP) on post-thaw quality, kinematics and *in vivo* fertility of fertile and subfertile buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Vet Res Commun*. 2023 Jan;47(1):61-72. doi: 10.1007/s11259-022-09928-1. Epub 2022 Apr 22. PMID: 35451670.
- ALCAY S, AKTAR A, KOCA D, KILIC MA, AKKASOGLU M, SAGIRKAY H. Positive effect of autologous platelet rich plasma on Saanen buck semen cryopreservation in non-breeding season. *Cryobiology*. 2021 Dec; 103:45-48. doi: 10.1016/j.cryobiol.2021.09.012. Epub 2021 Oct 26. PMID: 34710381.
- ALECRIM, A. M. de L.; OLIVEIRA, R. S. de; LEITE, A. R. da S. S. Benefício do plasma sanguíneo na estética: revisão da literatura. *Revista Ibero-Americana De Humanidades, Ciências E Educação*, v. 9, n. 10, p. 1366–1381, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.51891/rease.v9i10.11536>. Acesso em: 10 out. 2025.
- AMARAL CS, KOCH J, CORREA JÚNIOR EE, et al. Heat stress on oocyte or zygote compromises embryo development, impairs interferon tau production and increases reactive oxygen species and oxidative stress in bovine embryos produced *in vitro*. *Mol Reprod Dev*. 2020;1–11. <https://doi.org/10.1002/mrd.23407>.
- ATKINSON, L.; MARTIN, F.; STURMEY, R. G. Injeção intraovariana de plasma rico em plaquetas na reprodução assistida: muito cedo demais? *Humano*. *Reprod*. 36 :1737–1750. 2021.
- ANTONIAZZI, Alfredo Q.; AMARAL, Carolina dos Santos; BRID, Alessandra. Ações do interferon tau durante o reconhecimento materno da gravidez. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 2, pág. 196-203, abr./jun. 2019.
- AGARWAL A, MALDONADO ROSAS I, ANAGNOSTOPOULOU C, CANNARELLA R, BOITRELLE F, MUNOZ LV, FINELLI R, DURAIRAJANAYAGAM D, HENKEL R, SALEH R. Oxidative Stress and Assisted Reproduction: A Comprehensive Review of Its Pathophysiological Role and Strategies for Optimizing Embryo Culture Environment. *Antioxidants (Basel)*. 2022 Feb 28;11(3):477. doi: 10.3390/antiox11030477. PMID: 35326126; PMCID: PMC8944628.
- BAUST, J. M.; BUEHRING, G. C.; CAMPBELL, L. et al. Melhores práticas em cultura de células: uma visão geral. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, v. 53, n. 8, p. 669–672, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11626-017-0177-7>. Acesso em: 01 out. 2025.

BEITIA, M. et al. Ação do plasma rico em plaquetas na bioatividade celular *in vitro*: mais que plaquetas. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 6, p. 3, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/6/5367>. Acesso em: 10 out. 2025.

BELENICHEV, Igor F. et al. Involvement of heat shock proteins HSP70 in the mechanisms of endogenous neuroprotection: the prospect of using HSP70 modulators. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 17, 2023.

Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2023.1131683/full>. Acesso em: 12 abr. 2025. DOI: 10.3389/fncel.2023.1131683.

BINELLI, M. et al. Bovine interferon-tau stimulates the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathway in bovine endometrial epithelial cells. *Biol Reprod*, v.64, n.2, p.654-665, 2001.

BIRÓ É, Akkerman JWN, Hoek FJ, Gorter G, Pronk LM, Sturk A, Nieuwland R. The phospholipid composition and cholesterol content of platelet-derived microparticles: a comparison with platelet membrane fractions. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 2754–63

BRACKETT, B.G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M.L.; DONAWICK, W.J.; EVANS, J.F.; DRESSEL, M.A. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biology of Reproduction*, v.27, p.147-158, 1982.

BODIS, J.; PAPP, S.; VERMES, I.; SULYOK, E.; TAMAS, P.; FARKAS, B.; ZAMBO, K.; HATZIPETROS, I.; KOVACS, G.L. “Platelet-associated regulatory system (PARS)” with particular reference to female reproduction. *J. Ovarian Res.*7, 55. 2014.

BOS-MIKICH, A.; OLIVEIRA, R.; FRANTZ, N. Platelet-rich plasma therapy and reproductive medicine. *J Assist Reprod Genet* 35, 753–756. 2018.

BOZZI, Alexandre da Rocha. O impacto das alterações lipídicas e sua relação com a criopreservação, capacitação e fertilidade espermática de touros Nelore. 2025. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2025. doi:10.11606/T.10.2025.tde-11062025-161908. Acesso em: 2025-09-29.

BERA, S., Pramanik, A., Menda, R., Shah, V., Prasad, S., Santra, A., Rai, S. e Das, S.K. (2024). Effect of Different Growth Factors on *in vitro* Developmental Competence and Quality of Cattle Oocytes. *Indian Journal of Animal Research*. doi:10.18805/IJAR.B-5269.

CAMARGO, F. F. Efeito do plasma rico em plaquetas e da fibrina rica em plaquetas na cicatrização de feridas cutâneas em ratos [tese]. Porto Alegre (RS): Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 184p. 2013.

CHAZAUD C, YAMANAKA Y. Especificação de linhagem no embrião de pré-implantação de camundongo. *Desenvolvimento*. 2016; 143:1063-1074

CLERICO, E. M.; TILITSKY, J. M.; MENG, W.; GIERASCH, L. M. How Hsp70 molecular machines interact with their substrates to mediate diverse physiological functions. *Journal of Molecular Biology*, v. 427, n. 7, p. 1575–1588, 2015. DOI: 10.1016/j.jmb.2015.02.004.

COSTA, P. A. Plasma rico em plaquetas: uma revisão sobre seu uso terapêutico. RBAC, Rio de Janeiro, v. 48, n. 4, p. 311–319, out./dez. 2016.

DA COSTA, N. N. et al. Effect of cortisol on bovine oocyte maturation and embryo development *in vitro*. Theriogenology, v. 85, n. 2, p. 323–329, 15 jan. 2016b.

DONADUSSI, M. Revisão Sistemática da Literatura sobre a Efetividade Clínica do Plasma Rico em Plaquetas para o Tratamento Dermatológico Estético [tese]. Porto Alegre (RS): Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. 99 p. 2012.

DU PLESSISS, AGARWAL A, MOHANTY G & VAN DER LINDE M 2015 Fosforilação oxidativa versus glicólise: qual combustível os espermatozoides utilizam? *Asian Journal of Andrology* 17230–235. (<https://doi.org/10.4103/1008-682X.135123>)

DURANTI, R. G. de. Expressão de HSP70 e GLUT1 em embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro*. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/39750>. Acesso em: 13 abr. 2025.

DUSSE, L. M. S.; MACEDO, A. P.; BATSCHAUER, A. P.; CARVALHO, M. G. Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e sua aplicação em Odontologia. RBAC. 40(3):193-7. 2008.

EALY, Alan D.; WOOLDRIDGE, Lydia K. The evolution of interferon-tau. *Reproduction*, v. 154, n. 5, p. F1–F10, nov. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28982935/>. Acesso em: [30/03/2025].

EDWARDS LJ, Batt PA, Gandolfi F, Gardner DK. Modifications made to culture medium by bovine oviduct epithelial cells: changes to carbohydrates stimulate bovine embryo development. *Mol Reprod Dev*. 1997 Feb;46(2):146-54. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199702)46:2<146:AID-MRD5>3.0.CO;2-Q. PMID: 9021746.

FELDSER, D. et al. Regulação positiva recíproca do fator induzível por hipóxia 1alfa e do fator de crescimento semelhante à insulina 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, [S.l.], v. 96, n. 12, p. 6741–6746, 1999. DOI: 10.1073/pnas.96.12.6741. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10463582/>. Acesso em: 14 abr. 2025.

FERRÉ, L. B. et al. Recent advances in bovine *in vitro* embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal Reproduction Science*, [s.l.], v. 43, n. 2, p. 156-159, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>. Acesso em: [20/03/2025].

FERRÉ, L.B.; Kjelland, M.E.; Strøbech, L.B.; Hyttel, P.; Mermillod, P.; Ross, P.J. Review: Recent Advances in Bovine *in Vitro* Embryo Production: Reproductive Biotechnology History and Methods. *Animal* 2020, 14, 991–1004.

FONTANA F, Giannitti G, Marchesi S, Limonta P. The PI3K/Akt Pathway and Glucose Metabolism: A Dangerous Liaison in Cancer. *Int J Biol Sci*. 2024 May 27;20(8):3113-3125. doi: 10.7150/ijbs.89942. PMID: 38904014; PMCID: PMC11186371.

FORDE N, Lonergan P. Interferon-tau and fertility in ruminants. *Reproduction*. 2017 Nov;154(5):F33-F43. doi: 10.1530/REP-17-0432. Epub 2017 Sep 8. PMID: 28887326.

FUJII, T.; MUKAI, T.; HASEGAWA, S.; HIRATA, T.; SAWAI, K. Evaluation of bovine embryo quality based on gene expression profiling using whole-transcriptome amplification. *Journal of Reproduction and Development*, v. 70, n. 4, p. 259–263, 2024.

FUKAI T, USHIO-FUKAI M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Sep 15;15(6):1583-606. doi: 10.1089/ars.2011.3999. Epub 2011 Jun 6. PMID: 21473702; PMCID: PMC3151424.

GADELLA, B.M.; RATHI, R.; BROUWERS, J.F.; STOUT, T.A.E.; COLEMBRANDER, B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Animal Reproduction Science*, v.68, n.4, p.249-265, 2001.

GALLI, C.; LAZZARI, G. Practical aspects IVM-IVF in cattle. *Anim. Reprod. Sei.*, v.42, p.371-379, 1996.

GARDNER DK, VELLA P, LANE M, WAGLEY L, SCHLENKER T, SCHOOLCRAFT WB. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril* 1998; 69:84-8.

GASPERINI G. Análise quantitativa do protocolo de obtenção do plasma rico em plaquetas do núcleo de cirurgia e traumatologia bucomaxilofacial do HU-UFSC. Florianópolis. Tese [Especialização em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial do HU-UFSC] - Universidade Federal de Santa Catarina; 2003.

GONÇALVES, P.B.D.; OLIVEIRA, M.A.L.; MEZZALIRA, A.; MONTAGNER, M.M.; VISINTIN, J.A.; COSTA, L.F.S. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. (Eds.). *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. São Paulo: Roca, p. 261–291, 2008

GONÇALVES, N. J. N.; FRANTZ, N.; OLIVEIRA, R. M. Platelet-rich plasma (PRP) therapy: an approach in reproductive medicine based on successful animal models. *Animal Reproduction*, 16(1), 93. 2020.

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.

GORDON, E. Produção laboratorial de embriões de gado. CABI Publishing, Reino Unido, p. 176-219. 2003.

GRAY, C.A. et al. Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and elongation. *Reproduction*, v.124, n.2, p.289-300, 2002.

GONÇALVES, P. B. D.; VISINTIN, J. A.; OLIVEIRA, M. A. L.; MONTAGNER, M. M.; COSTA, L. F. S. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. (Org.). *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Varela, 2002. p. 195-226.

HE S, Pant D, Schiffmacher A. Developmental expression of pluripotency determining factors in caprine embryos: Novel pattern of NANOG protein localization in the nucleolus. *Mol Reprod Dev*, v.73, p.1512-1522, 2006.

HENKEL, R., & SCHILL, W. B. (2003). Sperm preparation for ART. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1(1), 108. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-108>.

HOMOBONO, B. P. et al. Fertilization with follicular fluid reduces HSP70 and BAX expression on bovine *in vitro* embryos. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 59, n. 4, p. e14548, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/rda.14548>. Acesso em: 20 abril. 2025

HUANG, Y. et al. Um mecanismo molecular para a geração de saídas diferenciais dependentes de ligante pelo receptor do fator de crescimento epidérmico. *eLife*, v. 10, p. e73218, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.7554/eLife.73218>. Acesso em: 03 mar. 2025.

INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY – IETS. *2017 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals*. 2017. Disponível em: https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2017.pdf. Acesso em: 16 fev. 2025.

ITALIANO, J. E.; HARTWIG, J. H. Megakaryocyte development and platelet formation. In: MICHELSON, A. D. *Platelets*. California: Academic Press, 2002.

KIM, JY, HUANG, M., LEE, JE E YENARI, MA (2019). “Papel das Proteínas de Choque Térmico (HSP) na Neuroproteção para AVC Isquêmico”, em *Proteínas de choque térmico em neurociência*. Proteínas de choque térmico, Vol. 20, eds. A. Asea e P. Kaur (Cham: Springer), doi: 10.1007/978-3-030-24285-5_6

KRISHER RL, Herrick JR. Bovine embryo production *in vitro*: evolution of culture media and commercial perspectives. *Anim Reprod*. 2024 Sep 23;21(3):e20240051. doi: 10.1590/1984-3143-AR2024-0051. PMID: 39372256; PMCID: PMC11452098.

KANG SS, Koyama K, Huang W, Yang Y, Yanagawa Y, Takahashi Y, Nagano M. Addition of D-penicillamine, hypotaurine, and epinephrine (PHE) mixture to IVF medium maintains motility and longevity of bovine sperm and enhances stable production of blastocysts *in vitro*. *J Reprod Dev*. 2015;61(2):99-105. doi: 10.1262/jrd.2014-112. Epub 2014 Dec 13. PMID: 25501343; PMCID: PMC4410307.

LEESE, H. J.; BRISON, D. R.; STURMEY, R. G. A hipótese do embrião silencioso: 20 anos depois. *Frontiers in Physiology*, v. 13, art. 899485, 2022. DOI: 10.3389/fphys.2022.899485. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2022.899485/full>. Acesso em: 10 out. 2025.

LEESE HJ (2002). Silêncio, por favor, não perturbe: uma hipótese sobre o metabolismo e a viabilidade embrionária. *BioEssays* 24, 845–849. doi:10.1002/bies.10137

LEESE HJ, McKeegan PJ, SturmeY RG. Amino Acids and the Early Mammalian Embryo: Origin, Fate, Function and Life-Long Legacy. *Int J Environ Res Public Health*. 2021 Sep 19;18(18):9874. doi: 10.3390/ijerph18189874. PMID: 34574797; PMCID: PMC8467587.

LEMSEFFER, Yassir et al. Methods for Assessing Oocyte Quality: A Review of Literature. *Biomedicines*, v. 10, n. 9, p. 2184, 4 set. 2022. DOI: 10.3390/biomedicines10092184. Disponível em: PMC9495944. Acesso em: [21/03/2025].

LENSEN, L. A fresh view of glycolysis and glucokinase regulation: history and current status. *Journal of Biological Chemistry*, v. 289, n. 18, p. 12189–12194, 17 mar. 2014. Disponível em: <https://europepmc.org/article/MED/24637025>. Acesso em: 13 abr. 2025.

LUCY MC, Pohler KG. North American perspectives for cattle production and reproduction for the next 20 years. *Theriogenology*. 2025 Jan 15; 232:109-116. doi: 10.1016/j.theriogenology.2024.11.006. Epub 2024 Nov 6. PMID: 39536622.

LI, Xueyi et al. Hsp70 suprime espécies reativas de oxigênio mitocondriais e preserva a integridade da barreira microvascular pulmonar após exposição a toxinas bacterianas. *Frontiers in Immunology*, [S. l.], v. 9, p. 1309, 12 jun. 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01309.

LUEDKE, Felipe Eduardo; LAVACH, F. L.; CASSANTA, F. G.; NUNES, L. F. N.; SCHLOTEFELDT, C.; DE PAIVA, S. M.; DOS SANTOS, S. I.; NEVES, A. P. Aspectos da produção *in vitro* de embriões bovinos no Brasil – revisão. *ISSN online: 2595-7686 ISSN Impresso: 0104-9070*, p. 120-128, 2019.

LUNT, S. Y.; VANDER HEIDEN, M. G. Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, v. 27, p. 441-64, 2011. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154237.

MAREI WFA, Van Raemdonck G, Baggerman G, Bols PEJ, Leroy JLMR. Proteomic changes in oocytes after *in vitro* maturation in lipotoxic conditions are different from those in *cumulus* cells. *Sci Rep*. 2019 Mar 6;9(1):3673. doi: 10.1038/s41598-019-40122-7. PMID: 30842615; PMCID: PMC6403224.

MARINI, MG, Perrini, C., Esposti, P. *et al.* Efeitos do plasma rico em plaquetas em um modelo de inflamação endometrial bovina *in vitro*. *Reprod Biol Endocrinol* 14, 58 (2016). <https://doi.org/10.1186/s12958-016-0195-4>.

MARQUES, A. P. L. *et al.* Padronização de técnica manual para obtenção de plasma rico em plaquetas de bovino. *Clinical Oral Investigations*, v. 34, n. 8, p. 1–6, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s12958-016-0195-4>.

MARQUES, L., Missio, D., Mattos, K. de Cibir, FW, Leivas, FG, & Brum, D. dos S. (2023). Correlação entre cinética espermática *in vitro*, avaliações de estresse oxidativo e fertilidade de campo de sêmen de touro criopreservado. *Semina: Ciências Agrárias* 44 (5), 1841–1858. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2023v44n5p1841>

MAUCHART P, Vass RA, Nagy B, Sulyok E, Bódis J, Kovács K. Oxidative Stress in Assisted Reproductive Techniques, with a Focus on an Underestimated Risk Factor. *Curr Issues Mol Biol*. 2023 Feb 3;45(2):1272-1286. doi: 10.3390/cimb45020083. PMID: 36826028; PMCID: PMC9954903.

MCCLELLAND Descalzo DL, Satoorian TS, Walker LM, Sparks NR, Pulyanina PY, Zur Nieden NI. Glucose-Induced Oxidative Stress Reduces Proliferation in Embryonic Stem Cells via FOXO3A/ β -Catenin-Dependent Transcription of p21(cip1). *Stem Cell Reports*. 2016 Jul 12;7(1):55-68. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.06.006. PMID: 27411103; PMCID: PMC4945584.

MEDVEDV SV, SHEVCHENKO AI, MAZUROK NA, ZAKIAN SM. Oct4 and NANog are the key genes in the system of pluripotency maintenance in mammalian cells. *Russ J Genet*, v.44, p.1377-1393, 2008.

MEULDERS, Ben; MAREI, WALEED F. A.; LOIER, Lien; LEROY, Jo L. M. R. Lipotoxicity and Oocyte Quality in Mammals: Pathogenesis, Consequences, and Reversibility. *Annual Review of Animal Biosciences*, v. 13, p. 233–254, 2025. DOI: 10.1146/annurev-animal-111523-102249.

MILAZZOTTO MP, ISPADA J, DE LIMA CB. Metabolism-epigenetic interactions on *in vitro* produced embryos. *Reprod Fertil Dev*. 2022 Dec;35(2):84-97. doi: 10.1071/RD22203. PMID: 36592974.

MILLER, G. et al. Addition of penicillamine, hypotaurine and epinephrine (PHE) or bovine oviductal epithelial cells (BOEC) alone or in combination to bovine *in vitro* fertilization medium increases the subsequent embryo cleavage rate. *Theriogenology*, v. 41, n. 3, p. 689-696, 1994.

MIRANDO, M.A. et al. Stimulation of 2',5'-oligoadenylate synthetase activity in sheep endometrium during pregnancy, by intrauterine infusion of ovine trophoblast protein-1, and by intramuscular administration of recombinant bovine interferon-alpha II. *J Reprod Fertil*, v.93, n.2, p.599-607, 1991.

MOORE, Keith L. *Embriologia clínica*. 10. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

MOULAVI F, Akram RT, Khorshid Sokhangouy S, Hosseini SM. Platelet rich plasma efficiently substitutes the beneficial effects of serum during *in vitro* oocyte maturation and helps maintain the mitochondrial activity of maturing oocytes. *Growth Factors*. 2020 Jun-Jul;38(3-4):152-166. doi: 10.1080/08977194.2021.1900168. Epub 2021 Mar 19. PMID: 33739231.

MEN H. Evolution of Media Supporting the Development of Mammalian Preimplantation Embryos *In Vitro*. *Biology (Basel)*. 2024 Oct 1;13(10):789. doi: 10.3390/biology13100789. PMID: 39452098; PMCID: PMC11504863. H. Evolution of Media Supporting the Development of Mammalian Preimplantation Embryos *In Vitro*. *Biology (Basel)*. 2024 Oct 1;13(10):789. doi: 10.3390/biology13100789. PMID: 39452098; PMCID: PMC11504863.

NAGY, B.; KOVÁCS, K.; SULYOK, E.; VÁRNAGY, Á.; BÓDIS, J. Trombócitos e Plasma Rico em Plaquetas como Moduladores de Reprodução e Fertilidade. *Internacional J. Mol. Ciência*. 24, 17336. 2023.

NAGY, B.; SULYOK, E.; VARNAGY, A.; BARABAS, A.; KOVACS, K.; BODIS, J. The role of platelets in reproduction. *Orv. Hetil*. 163, 1254–1260. 2022.

OLIVEIRA, C. et al. Biotécnicas da reprodução em bovinos: minicursos ministrados durante o 3º Simpósio “Biotécnicas da Reprodução em Bovinos”. Embrapa Gado de Leite. v. 175, p. 52, 2014.

OLSON, A.L., PESSIN, J.E. Estructure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. *Annual Reviews Nutrition*, v. 16, p.235- 56, 1996.

PESTKA S, KRAUSE CD, WALTER MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev.* 2004 Dec; 202:8-32. doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.00204. x. PMID: 15546383.

KIM, J.B.; ZAEHRES, H.; WU, G.; GENTILE, L.; KO, K.; SEBASTIANO, V.; ARAÚZO-BRAVO, M.J.; RUAU, D.; HAN, D.W.; ZENKE, M.; SCHÖLER, H.R. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature*, v. 454, p. 646-650, jul. 2008.

PARRISH, J. J. Bovine *in vitro* fertilization: *In vitro* oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology*, v. 81, p. 67–73, 2014. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2013.08.005.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.08.005>. Acesso em: 1 maio 2025.

PAVANI, A. A.; FERNANDES, T. R. L. Plasma rico em plaquetas no rejuvenescimento cutâneo facial: uma revisão de literatura. *Uningá Review*, 29(1). 2017.

PAZOKI, H. et al. The effects of platelet lysate on maturation, fertilization and embryo development of NMRI mouse oocytes at germinal vesicle stage. *Reproductive Medicine and Biology*, v. 15, n. 2, p. 115–120, 2016.

PENARIOL, Leticia Bruna Corrêa. Influência dos métodos de seleção espermática (swim-up, gradiente de Percoll® e washing), na Fertilização *in vitro*, associado a dinâmica do desenvolvimento embrionário em bovinos. 2017. 19 f. (Monografia) – Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Biologia, Uberlândia, 2017.

RAMOS, E., PATIÑO, P., REITER, RJ, GIL-MARTÍN, E., MARCO-CONTELLAS, J., PARADA, E. et al. (2017). Lesão cerebral isquêmica: novos insights sobre o papel protetor da melatonina. *Free Radic. Biol. Med.* 104, 32–53. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.005.

RIZOS, D.; GUTIÉRREZ, A. A.; PÉREZ, G. J. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implicatons for blastocyst yield and blastocyst quality. *Biology of Reproduction*, Champaign, v. 68, n. 1, p. 236-243, 2003.

RIZOS, D.; CLEMENTE, M.; BERMEJO-ÁLVAREZ, P.; DE LA FUENTE, J.; LONERGAN, P.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Consequences of *in vitro* culture conditions on embryo development and quality. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 43, p. 44–50, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01230.x>. Acesso em: 03 mar. 2025.

RIZOS D, LONERGAN P, Boland MP, Arroyo-Garcia R, Pintado B, de la Fuente J, Gutierrez-Adan A, 2002: Análise da expressão diferencial de RNA mensageiro entre blastocistos bovinos produzidos em diferentes sistemas de cultura: implicações para a qualidade do blastocisto. *Biol Reprod* 66, 589– 595.

ROBERTS, M. et al. Interferons and the maternal-conceptus dialog in mammals. *Semin celi Dev Biol*, v. 19, n. 2, 170-7. 2008. ROSENZWEIG, R. et al. The Hsp70 chaperone network. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 20, n. 11, p. 665–680, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41580-019-0133-3>.

RAMOS-DEUS P, SANTOS Nascimento P, VIEIRA JIT, CHAVES MS, ALBUQUERQUE KA, FERREIRA-SILVA JC, GRÁZIA JGV, SANTOS FILHO AS, BATISTA AM, TEIXEIRA VW, OLIVEIRA MAL. Application of platelet-rich plasma in the *in vitro* production of bovine embryos. *Trop Anim Health Prod*. 2020 Nov;52(6):2931-2936. doi: 10.1007/s11250-020-02307-5. Epub 2020 Jun 23. PMID: 32572854.

RAMOS-IBEAS P, GIMENO I, CAÑÓN-BELTRÁN K, GUTIÉRREZ-ADÁN A, RIZOS D, GÓMEZ E. Senescence and Apoptosis During *in vitro* Embryo Development in a Bovine Model. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Dec 18; 8:619902. doi: 10.3389/fcell.2020.619902. PMID: 33392207; PMCID: PMC7775420.

REHMAN, N. U.; SARWAR, M.; SAMAD, H. A. *In vitro* production of bovine embryos A review. *Asian-Aust. J. Anim. Sci*, v. 14, n. 9, p. 1342-1351, 2001.

RODRÍGUEZ-ALONSO, B.; MAILLO, V.; ACUNA, OS; LÓPEZ-ÚBEDA, R.; TORRECILLAS, A.; SIMINTIRAS, CA; STURMEY, R.; AVILÉS, M.; LONERGAN, P.; RIZOS, D. Mudanças espaciais e relacionadas à gravidez na composição de proteínas, aminoácidos e carboidratos do fluido do oviduto bovino. *Internacional J. Mol. Ciência*. 2020, 21, 1681. <https://doi.org/10.3390/ijms21051681>

SANTOS S, SIGURJONSSON ÓE, CUSTÓDIO CA, MANO J. Derivados de plasma sanguíneo para engenharia de tecidos e terapias de medicina regenerativa. *Tissue Eng Parte B Rev*. 2018;24(6):454–62.

SCOTT R 3rd, ZHANG M, SELI E. Metabolism of the oocyte and the preimplantation embryo: implications for assisted reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2018 Jun;30(3):163-170. doi: 10.1097/GCO.0000000000000455. PMID: 29708901.

SIESS, W. Athero- and thrombogenic actions of lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate. *Biochim. Biophys. Acta*. 1582, 204–215. 2002.

SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 35, n. 4, p. 370-384, out./dez. 2011. Disponível em: www.cbra.org.br. Acesso em: 3 maio 2025.

SIMMET, Kilian; KUROME, Mayuko; ZAKHARTCHENKO, Valeri; REICHENBACH, Horst-Dieter; SPRINGER, Claudia; BÄHR, Andrea; BLUM, Helmut; PHILIPPOU-MASSIER, Julia; WOLF, Eckhard. OCT4/POU5F1 é indispensável para a diferenciação da linhagem da massa celular interna em embriões bovinos. *The FASEB Journal*, v. 36, n. 6, e22337, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1096/fj.202101713RRR>. Disponível em: <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fj.202101713RRR>. Acesso em: 26 mar. 2025.

SOUZA, E. B. et al. Use of platelet-rich plasma on *in vitro* maturation during bovine embryo production. *Veterinary and Animal Science*, [S.l.], v. 26, p. 100328, 2024. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10984563/>. Acesso em: 19 abr. 2025.

STAMPERNA K, Giannoulis T, Dovolou E, Kalemkeridou M, Nanas I, Dadouli K, Moutou K, Mamuris Z, Amiridis GS. Heat shock protein 70 improves *in vitro* embryo yield and quality from heat stressed bovine oocytes. *Animals*. 2021;11(6):1794. <https://doi.org/10.3390/ani11061794>.

SULZBACHER, Maicon Machado; LUDWIG, Mirna Stela; HECK, Thiago Gomes. Oxidative stress and decreased tissue HSP70 are involved in the genesis of sepsis: HSP70 as a therapeutic target. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 585–591, 2020. Disponível em: <https://criticalcarescience.org/article/oxidative-stress-and-decreased-tissue-hsp70-are-involved-in-the-genesis-of-sepsis-hsp70-as-a-therapeutic-target/>. Acesso em: 12 abr. 2025. DOI: 10.5935/0103-507X.20200084.

SHAN S, Xu F, HIRSCHFELD M, BRENIG B. Sperm Lipid Markers of Male Fertility in Mammals. *Int J Mol Sci*. 2021 Aug 16;22(16):8767. doi: 10.3390/ijms22168767. PMID: 34445473; PMCID: PMC8395862.

SEOL, D.-W.; LEE, S.; JEONG, P.-S.; et al. *Sperm hyaluronidase is critical to mammals' fertilization for its ability to disperse cumulus-oocyte complex layer*. *PLoS One*, v. 16, n. 12, e0261019, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9295470/>. Acesso em: 19 out. 2025.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, v. 126, p. 663-676, 25 ago. 2006

TRÍBULO, P.; RABAGLINO, M.B.; BO, M.B.; CARVALHEIRA, L.R.; BISHOP, J.V.; HANSEN, T.R.; HANSEN, P.J. Dickkopf-related protein 1 is a progesterone acting on the bovine embryo during the morula to-blastocyst transition to program trophoblast elongation. *Scientific Reports*. v. 9, p. 11816, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48374-z>
VAN DER VALK, J. et al. Fetal Bovine Serum (FBS): Past - Present - Future. *Altex*, v. 35, n. 1, p. 99–118, 2018.

TRUONG T, GARDNER DK. Antioxidants improve IVF outcome and subsequent embryo development in the mouse. *Hum Reprod*. 2017 Dec 1;32(12):2404-2413. doi: 10.1093/humrep/dex330. PMID: 29136144.

VENDRAMIN, F. S.; FRANCO, D.; NOGUEIRA, C. M.; PEREIRA, M. S.; FRANCO, T. R. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de preparo e utilização em cirurgia plástica. *Revista Do Colégio Brasileiro De Cirurgiões*, 33(1), 24–28. 2006.

VIANA, João Henrique Moreira. In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES. *Jornal O Embrião*. Edição 74, ano XXXVII, 2º semestre 2024, p. 9.

WANG, Wei-Hua; DAY, Billy N.; WU, Guang-Ming. How Does Polyspermy Happen in Mammalian Oocytes? *Microscopy Research and Technique*, v. 61, n. 4, p. 335-341, 2003. DOI: 10.1002/jemt.10346.

WHEELER, M. B.; RUBESSA, M. Integration of microfluidics in animal *in vitro* embryo production. *Molecular Human Reproduction*, v. 23, n. 4, p. 248–256, 2017. DOI: 10.1093/molehr/gaw048.

YU, J.; VODYANIK, M.A.; SMUGA-OTTO, K.; ANTOSIEWICZ-BOURGET, J.; FRANE, J.L.; TIAN, S.; NIE, J.; JONSDOTTIR, G.A.; RUOTTI, V.; STEWART, R.; SLUKVIN, I.I.; THOMSON, J.A. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, v. 318, n. 5858, p. 1917–1920, nov. 2007.

YAN B, ZHANG Y, TIAN S, Hu R, Wu B. Effect of autologous platelet-rich plasma on human sperm quality during cryopreservation. *Cryobiology*. 2021 Feb; 98:12-16. doi: 10.1016/j.cryobiol.2021.01.009. Epub 2021 Jan 19. PMID: 33476642.

ZENKER S. Platelet rich plasma (PRP) for facial rejuvenation. *J. Méd. Esth. et Chir. Derm.* XXXVII (148):179-83. 2010.