

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Departamento de Genética e Evolução

Gil Neves Pinto de Oliveira

**IL-10 NA COMPETÊNCIA OOCITÁRIA APÓS A REFRIGERAÇÃO DE OVÁRIOS E
DE COMPLEXOS CUMULUS-OÓCITOS DE MAJORITARIAMENTE *Bos taurus*
*indicus***

São Carlos - SP

2025

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Departamento de Genética e Evolução

Gil Neves Pinto de Oliveira

**IL-10 NA COMPETÊNCIA OOCITÁRIA APÓS A REFRIGERAÇÃO DE OVÁRIOS E
DE COMPLEXOS CUMULUS-OÓCITOS DE MAJORITARIAMENTE *Bos taurus*
*indicus***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado junto à Universidade
Federal de São Carlos como requisito
para a obtenção do título de Bacharel
em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Mateus J.
Sudano

São Carlos - SP

2025

À minha família, que, mesmo sem ter tido as mesmas oportunidades, me apoiou em tudo o que eu precisava para chegar até aqui. Ser o primeiro a ingressar e concluir uma universidade é uma vitória que divido com cada um de vocês, construída com esforço, fé e muito amor.

AGRADECIMENTOS

A conclusão da minha graduação e a realização deste trabalho são frutos de uma caminhada marcada por desafios, dedicação, aprendizados, conquistas e, principalmente, por apoio e companheirismo. Por isso, expresso aqui minha sincera gratidão a todos que, de alguma forma, fizeram parte dessa trajetória.

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar saúde, coragem e sabedoria nos momentos mais difíceis. Sem fé e perseverança, este sonho não teria se concretizado.

À minha família, especialmente meus pais e irmãos, que são minha maior base e inspiração. Obrigado por acreditarem em mim, por cada incentivo, por cada gesto de carinho, cada sacrifício feito em silêncio e por estarem ao meu lado em todas as etapas dessa jornada.

Aos meus queridos amigos que a universidade me deu: Beatriz, Rafaela, Guilherme, Ana Laura e Mariana. Obrigado por dividirem bons momentos, risos, estudos, por comemoraram minhas vitórias e tornaram essa fase mais leve e significativa.

Sou grato à Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), não só por me proporcionar uma formação de excelência, mas também por um sonho. Aos meus professores e orientadores de graduação, pelos conhecimentos compartilhados. Ao Laboratório de Tecnologia de Embriões (LTE) e a todos os seus membros, pela colaboração e auxílio durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço às agências de fomento CNPq e FAPESP (processo número 2018/21496-8), pelo suporte financeiro que possibilitou o desenvolvimento da pesquisa apresentada neste trabalho.

E, por fim, agradeço ao meu orientador, Professor Mateus Sudano, por sua orientação e confiança em meu trabalho ao longo desses anos. Seu apoio foi essencial para que este trabalho se tornasse realidade.

A todos, meu sincero muito obrigado.

RESUMO

A utilização de ovários provenientes de abatedouro é uma prática recorrente para a pesquisa envolvendo o desenvolvimento inicial do animal, entretanto, o tempo de transporte desses ovários e de manuseio antes do cultivo podem afetar negativamente a competência dos oócitos. A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória com potencial regulador no ambiente embrionário e no desenvolvimento de blastocistos. Este trabalho teve como objetivo avaliar se a interleucina IL-10 favorece a competência oocitária após a refrigeração de ovários ou de complexos cumulus-oócitos (CCOs) a 4 °C. O efeito da IL-10 foi avaliado em CCOs oriundos de ovários refrigerados a 4 °C ou mantidos a 30 °C durante o transporte até o laboratório e na refrigeração a 4 °C por 3h antes da maturação *in vitro* (MIV). Foram avaliadas a maturação nuclear, através do monitoramento da taxa de extrusão do primeiro corpúsculo polar, e a expansão das células do cumulus. Também foram investigadas a fragmentação do DNA dos oócitos e das células do cumulus (CCs), pela técnica de TUNEL, e a maturação citoplasmática, através da avaliação da distribuição dos grânulos corticais. Para análise estatística, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey. Adotou-se um nível de significância de 5%. Não foi identificado efeito ($P>0,05$) da IL-10 e da refrigeração sobre a expansão e fragmentação do DNA das CCs. Contudo, a taxa de extrusão do corpúsculo polar do grupo controle de ovários refrigerados ($23,3\pm 3,0\%$) foi inferior ($P<0,05$) aos demais grupos ($41,3\pm 6,3$; $48,0\pm 3,1$ e $39,6\pm 4,4\%$, respectivamente para tratamentos controle a 30 °C, IL-10 a 30 °C e IL-10 refrigerado). Nos grupos a 30 °C com IL-10, em ambos experimentos, foram obtidas menores porcentagens de DNA fragmentado nos oócitos (8,3%: 2/24 e 20,7%: 6/29). Além disso, os oócitos oriundos dos grupos refrigerados com adição da IL-10, tanto com objetivo da prevenção como da reversão, apresentaram uma porcentagem de apoptose (32,1%: 9/28 e 31,3%: 10/32) muito semelhante ao grupo controle a 30 °C (32,0%: 8/25). Conclui-se que a IL-10 foi efetiva no resgate da maturação nuclear de oócitos quando submetidos à refrigeração, contudo, sem efeitos perceptíveis sobre as células do cumulus e grânulos citoplasmáticos.

Palavras-chave: Interleucina-10; Maturação *in vitro*; Oócitos; Produção *in vitro* de embriões.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Transferências de embriões em gado no período de 2004-2023, de acordo com a técnica utilizada (derivada in vivo [IVD do inglês in vivo-derived] ou produzida in vitro [IVP do inglês in vitro-produced]) e tipo de embrião (fresco ou congelado-descongelado).....	10
Figura 2 - Delineamento do Experimento I: Efeito da IL-10 nos complexos cumulus-oócitos recuperados de ovários refrigerados.....	19
Figura 3 - Delineamento do Experimento II: Efeito da IL-10 nos complexos cumulus-oócitos durante a refrigeração.....	20
Figura 4 - Expansão das CCs antes e depois da MIV do Experimento I.....	25
Figura 5 - Efeito da IL-10 e da refrigeração na expansão das células do cumulus após 22h de MIV.....	25
Figura 6 - Extrusão do primeiro CP.....	26
Figura 7 - Análise TUNEL para avaliação da fragmentação do DNA dos oócitos.	28
Figura 8 - Classificação da distribuição morfoespacial dos grânulos corticais (GCs) dos oócitos.....	29
Figura 9 - Efeito de IL-10 e da refrigeração sobre a apoptose das CCs em porcentagem.	30
Figura 10 - Análise TUNEL para avaliação da fragmentação do DNA das CCs	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Maturação nuclear (%) do Experimento I avaliada por meio da extrusão do primeiro corpúsculo polar	26
Tabela 2 - Maturação nuclear (%) do Experimento II avaliada por meio da extrusão do primeiro corpúsculo polar	27
Tabela 3 - Porcentagem de fragmentação do DNA dos oócitos (Experimento I)	27
Tabela 4 - Porcentagem de fragmentação do DNA dos oócitos (Experimento II)	28
Tabela 5 - Maturação citoplasmática (Experimento I), distribuição morfoespacial dos GCs dos oócitos	29
Tabela 6 - Maturação citoplasmática (Experimento II), distribuição morfoespacial dos GCs dos oócitos	30

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 COMPETÊNCIA OOCITÁRIA.....	10
1.2 COMPETÊNCIA OOCITÁRIA E ESTRESSORES AMBIENTAIS EM BAIXAS TEMPERATURAS.....	11
1.3 CITOCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO.....	13
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 METODOLOGIA	17
3.1 COLETA, PROCESSAMENTO E MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> DOS COMPLEXOS CUMULUS-OÓCITO	17
3.2 EXPERIMENTO I - Efeito da Interleucina-10 (IL-10) nos complexos cumulus-oócitos recuperados de ovários refrigerados.	18
3.3 EXPERIMENTO II - Efeito da IL-10 nos complexos cumulus-oócitos durante a refrigeração.....	19
3.4 ENSAIOS ANALÍTICOS	20
3.4.1 Expansão dos Complexos Cumulus-Oócitos	20
3.4.2 Maturação Nuclear - Análise da Extrusão do Corpúsculo Polar	20
3.4.3 Fragmentação DNA dos Oócitos - TUNEL	21
3.4.4 Maturação Citoplasmática - Avaliação da Distribuição dos Grânulos Corticais	22
3.4.5 Fragmentação DNA das Células do Cumulus – TUNEL	23
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
4 RESULTADOS	25
4.1 EXPANSÃO DOS COMPLEXOS CUMULUS-OÓCITOS.....	25
4.2 MATURAÇÃO NUCLEAR - ANÁLISE DA EXTRUSÃO DO CORPÚSCULO POLAR .	26
4.3 FRAGMENTAÇÃO DNA DOS OÓCITOS - TUNEL	27
4.4 MATURAÇÃO CITOPLASMÁTICA - AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS GRÂNULOS CORTICAIS.....	28
4.5 FRAGMENTAÇÃO DNA DAS CÉLULAS DO CUMULUS – TUNEL	30
5 DISCUSSÃO	32
6 CONCLUSÃO	37
7 REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o setor pecuário do Brasil sofreu inúmeras modificações, das quais estavam relacionadas ao desenvolvimento e à aplicação da biotecnologia de maneira comercial, visando aumentar a velocidade da reprodução animal, aliada com o melhoramento genético, que vem sendo constantemente promovido em animais de produção (Lustosa et al., 2017). A técnica de produção *in vitro* (PIV) é uma tecnologia que vem sendo utilizada amplamente e está disponível para todo o território brasileiro. Essa técnica visa a obtenção de embriões fora do aparelho reprodutivo da fêmea, sendo composta por etapas como a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos, fecundação *in vitro* (FIV), e o cultivo *in vitro* (CIV) (Lustosa et al., 2017).

De acordo com o levantamento de dados da IETS (International Embryo Technology Society), o número de embriões produzidos *in vitro* (PIV) tem aumentado de forma contínua e intensa nos últimos 12 anos. Por sua vez, o número de embriões derivados *in vivo* (IVD) tomou uma tendência de queda, que está em andamento desde 2015 (figura 1). Podemos inferir que o crescimento atual no uso de embriões PIV tem sido estimulado, nos últimos anos, por uma expansão do mercado de embriões bovinos na adoção progressiva de tecnologias *in vitro*, em vez da superovulação na utilização de embriões *in vivo* (Viana, 2024). O crescimento no uso da produção *in vitro* de embriões (PIVE) foi impulsionada nos últimos anos, principalmente, pela América do Norte e Sul, onde os cinco maiores produtores são: EUA, Brasil, Argentina, Canadá e México. O Brasil, um protagonista no cenário mundial, apresenta-se em segundo lugar no número de embriões registrados em 2023 e ocupa o primeiro lugar em tamanho do rebanho de gado (Viana, 2024).

Devido ao rápido desenvolvimento de tecnologias de reprodução assistida, como a MIV, a FIV e a CIV, temos por consequência o aumento na demanda por oócitos de mamíferos para fins reprodutivos. Uma forma mais prática de obter esses oócitos a qualquer momento é por meio de sua preservação em temperaturas extremamente baixas. No entanto, devido ao desenvolvimento embrionário relativamente limitado a partir de oócitos congelados, esses ainda não são amplamente utilizados (Cetin e Bastan, 2006).

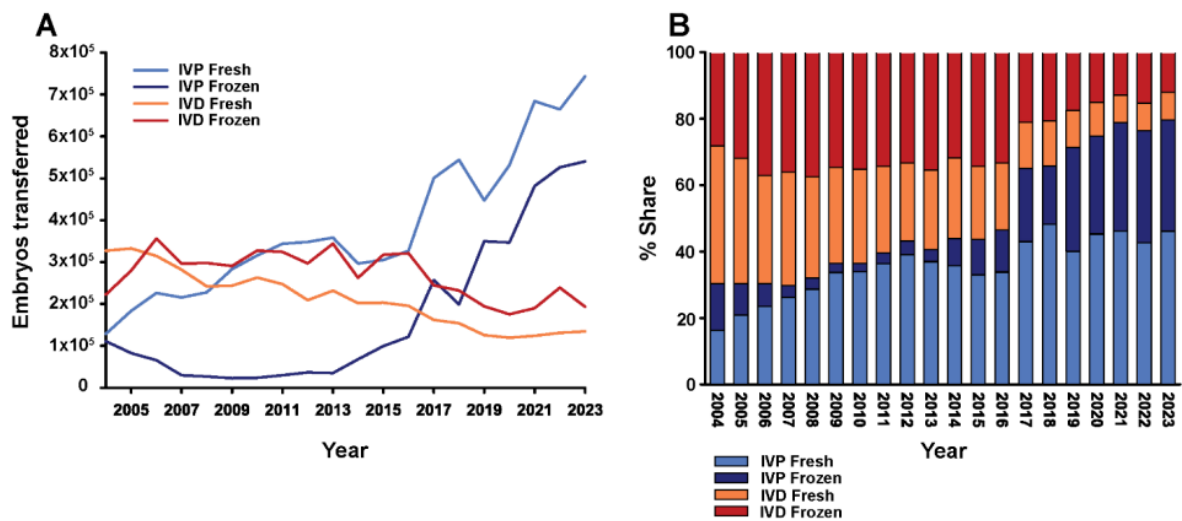


Figura 1 - Transferências de embriões em gado no período de 2004-2023, de acordo com a técnica utilizada (derivada *in vivo* [IVD do inglês *in vivo-derived*] ou produzida *in vitro* [IVP do inglês *in vitro-produced*]) e tipo de embrião (fresco ou congelado-descongelado). A) Número de embriões transferidos; B) Percentual da participação total das transferências de embriões por ano. Fonte: 2023 Estatística da produção e transferência de embriões de animais domésticos de produção. IETS – Data retrieval committee 2023 (Viana, 2024).

Vem sendo registrado desde 2006 um crescimento médio de 28% na produção de embriões de mamíferos FIV e uma redução de 73% na produção de embriões *in vivo*. Como o Brasil é um dos líderes na produção de embriões *in vitro*, acredita-se que o país continuará nessa posição e passará a fornecer, cada vez mais, genética animal para países interessados na produção (Lustosa et al., 2017). Com a melhoria dos métodos de FIV de oócitos de mamíferos ao longo dos anos e diante da alta demanda mundial por produção animal, o interesse em desenvolver técnicas eficazes para a preservação de gametas em baixas temperaturas tem incentivado estudos sobre os efeitos de temperaturas próximas a 0 °C em espermatozoides e oócitos de mamíferos (Martino, Pollard e Leibo, 1996).

1.1 COMPETÊNCIA OOCITÁRIA

Para o desenvolvimento embrionário e a FIV, os oócitos são selecionados majoritariamente de acordo com suas características morfológicas. No entanto, a competência do oócito pode ser acometida por diversos fatores e, mesmo com uma cuidadosa seleção e manuseio das células, o sucesso da FIV e do desenvolvimento embrionário subsequente são incertos na maioria das vezes (Labrecque e Sirard, 2014).

A capacidade, por exemplo, de um embrião bovino se desenvolver até o estágio de blastocisto é um processo extremamente complexo. A célula precisa retomar a meiose, que antes estava parada em metáfase II, realizar a clivagem após a fecundação para desenvolver o blastocisto e induzir a gestação de uma prole saudável (Sirard et al., 2006). Desta forma, vemos que a capacidade de desenvolvimento do embrião está relacionada também ao ambiente em que realizou-se o seu desenvolvimento (Hoelker et al., 2014).

A maioria dos critérios para avaliar a qualidade dos oócitos são morfológicos, como a qualidade do citoplasma do oócito, a espessura da zona pelúcida (ZP), a forma do corpúsculo polar (CP) e a posição do fuso meiótico (Labrecque e Sirard, 2014). A qualidade do oócito também pode ser avaliada de acordo com a qualidade do complexo cumulus-oócito (CCO), o número de camadas de células do cumulus, a coloração e diâmetro do oócito e o tamanho do espaço perivitelíneo (Hoelker et al., 2014). Outros fatores que afetam a foliculogênese também podem resultar em diferentes graus de competência oocitária (Sirard e Blondin, 1996). Uma peça importante para determinar a qualidade do oócito é o folículo de onde ele vem, seu tamanho folicular e seu nível de diferenciação (Blondin et al., 2018).

Apesar de alguns estudos apontarem que a origem dos oócitos é o principal fator que afeta a produção e desenvolvimento dos blastocistos (Rizos, 2002), os embriões apresentam grande plasticidade, ou seja, uma alta capacidade de se adaptar em condições *in vitro* de cultivo, mesmo que em situações desfavoráveis.

1.2 COMPETÊNCIA OOCITÁRIA E ESTRESSORES AMBIENTAIS EM BAIXAS TEMPERATURAS

Embriões bovinos que estão em estágio de pré-implantação podem exibir tolerância a estressores externos, como temperatura e gases atmosféricos e uma adaptação a ambientes de cultura pós-fecundação (Thompson et al., 1990). Entretanto, por conta da sua sensibilidade ao ambiente e seus possíveis estressores, é possível a ocorrência de alterações em seu desenvolvimento futuro (Gómez e Diez, 2000) que prejudiquem a sua competência.

O estresse térmico e a variação de temperatura estão entre os principais fatores responsáveis pela redução do desempenho reprodutivo em bovinos. Normalmente, o período de maior vulnerabilidade do embrião ocorre entre os estágios de 4 a 8 células, sendo que o estresse térmico pode comprometer todo o seu desenvolvimento até o estágio de blastocisto (Alves et al., 2012). Por serem mamíferos endotérmicos, os bovinos apresentam temperaturas corporais elevadas, variando aproximadamente entre 35 °C e 39 °C. Porém, com aumento da temperatura corporal, a função das células germinativas do embrião em desenvolvimento inicial, bem como de outras células envolvidas na reprodução, são diretamente comprometidas (Hansen, 2009). Em temperaturas acima de 39 °C, pode ocorrer a morte embrionária devido ao estresse térmico (Naranjo-Gómez et al., 2021). Nesse sentido, a maioria das práticas em laboratório de FIV realizam seus cultivos a rigorosos 37 °C - 38,5 °C, a fim de evitar o estresse térmico e, conseqüentemente, a diminuição da competência do oócito (Cairo Consensus Group et al., 2020).

De maneira geral, a uma fonte considerável de oócitos para a produção *in vitro* de embriões são de ovários coletados em abatedouros locais. Porém, o tempo de transporte dos ovários entre o abatedouro e o laboratório e o tempo de manuseio antes da cultura podem ser longos, o que afeta negativamente a qualidade dos oócitos. Assim, há uma grande perda da sua competência em termos de maturação nuclear dos oócitos, fecundação, clivagem e formação de blastocistos (Wongsrikeao et al., 2005).

A perda da qualidade dos oócitos de animais abatidos, durante o transporte, se deve à redução do fornecimento de oxigênio para as células, em decorrência da oclusão do fluxo sanguíneo. A falta de oxigênio no tecido provoca uma mudança do metabolismo aeróbico para anaeróbico, resultando na fermentação láctica para produção de energia e acúmulo de ácido láctico no interior da célula (Wongsrikeao et al., 2005). Como os ovários são transportados dos abatedouros para os laboratórios em armazenamento sem suprimento sanguíneo, a qualidade dos oócitos é influenciada por conta do estresse gerado pelo ambiente extracelular. Nesse contexto, o armazenamento de ovários em baixa temperatura pode retardar o acúmulo de subprodutos ácidos no interior da célula e prolongar a viabilidade dos oócitos, já que bovinos são animais homeotérmicos, e suas enzimas funcionam de forma mais eficiente à temperatura corporal. Porém, o metabolismo não é totalmente interrompido

em oócitos armazenados em estado descongelado, diferente dos que são armazenados em temperaturas criogênicas (Wongsrikeao et al., 2005).

A lesão pelo frio pode se desenvolver muito rapidamente. Em alguns casos, é difícil classificar os efeitos da taxa de resfriamento, que normalmente são atribuídos exclusivamente ao choque térmico ou à lesão indireta causada por frio (Martino, Pollard e Leibo, 1996). Estudos apontam que a exposição do oócito temperatura de 4 °C por 10 minutos é o suficiente para afetar a viabilidade oocitária e causar uma subsequente diminuição na maturação nuclear e citoplasmática, além do aumento de oócitos degenerados (Wu, Tong e Leibo, 1999). Porém, o tempo de exposição dos oócitos ao frio não é a principal causa dos danos relacionados, pois o aumento do tempo não altera a taxa de oócitos MII após a MIV (Sprícigo et al., 2012). Outros estudos também mostram que o armazenamento de 6 horas de ovários a 4 °C resulta em um menor número de oócitos com núcleos fragmentados de DNA e uma menor variação do pH do líquido folicular. Em contrapartida, o armazenamento em temperaturas mais quentes reduz o pH e tem efeitos prejudiciais na viabilidade, maturação, fecundação e desenvolvimento subsequente do oócito após a FIV. Porém, ovários armazenados a 35 °C por mais de 6 horas apresentam um aumento significativo na fragmentação do DNA em comparação com ovários armazenados por 3 h ou sem armazenamento (Wongsrikeao et al., 2005).

A taxa de prenhez obtida com embriões refrigerados é elevada em estudos que comparam sua eficácia reprodutiva à de embriões frescos e congelados convencionalmente. Porém, pouco se sabe sobre a preservação celular em condições hipotérmicas em mamíferos, especialmente em bovinos, uma vez que a criopreservação em nitrogênio líquido (N₂) tem sido amplamente utilizada para o armazenamento dessas estruturas (Ideta et al., 2013).

1.3 CITOCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

As citocinas são moléculas efetoras e mensageiras no sistema imunológico que possuem um papel extremamente importante nas respostas imunológicas, com o intuito de proteger ou contribuir para o desenvolvimento de doenças como alergia,

autoimunidade e câncer (Ouyang e O'Garra, 2019). Elas são reguladoras das respostas do hospedeiro à infecção, respostas imunes, inflamação e trauma. Algumas citocinas são classificadas como pró-inflamatórias, pois agem para agravar a doença, enquanto outras são classificadas como anti-inflamatórias, pois servem para reduzir a inflamação (Dinarello, 2000). A interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF), por exemplo, são citocinas pró-inflamatórias que causam febre, inflamação, destruição tecidual quando administradas em humanos, podendo, em alguns casos, ocasionar choque e até mesmo a morte (Dinarello, 2000).

As citocinas pró-inflamatórias presentes, tanto por expressão de mRNA quanto proteína, em embriões em estágio de pré-implantação avançado incluem: IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, GM-CSF, LIF, TNF- α e IFN- γ . Com exceção de IL-2 e IL-3, a maioria das citocinas pró-inflamatórias são expressas no estágio de oito células, mórula e blastocistos. Já em relação às citocinas anti-inflamatórias, temos: IL-1ra, IL-4, IL-5, IL-10, IL-11 e CSF-1. A expressão de IL-10 e IL-11 em blastocistos expandidos pré-eclosão é demonstrada, mas a expressão de outras citocinas anti-inflamatórias precisa ser mais estudadas e não são relatadas em embriões de nenhuma espécie (Seshagiri, Vani e Madhulika, 2016).

A família das citocinas da interleucina-10 (IL-10) são conhecidas por serem citocinas anti-inflamatórias. A presença de IL-10 no fluido folicular pré-ovulatório, em humanos, já foi relatada (Geva et al., 1997). Esta interleucina, conhecida como "fator inibidor da síntese de citocinas" (CSIF), possui importantes funções imunorreguladoras, atuando na proteção e regeneração tecidual, além de estar envolvida na regulação de processos inflamatórios (Verma et al., 2016; Ouyang e O'Garra, 2019). Além disso, a família desta citocina atua minimizando os efeitos inflamatórios de citocinas pró-inflamatórias na manutenção da homeostase tecidual, restringindo respostas inflamatórias excessivas por *feedback* positivo da imunidade inata (Verma et al., 2016; Ouyang e O'Garra, 2019). Em embriões bovinos produzidos *in vitro*, a IL-10 em 50 ng/ml atua como um regulador central da resposta inflamatória na competência e criosobrevivência destes, suprimindo a síntese do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e, conseqüentemente, atenuando seu impacto negativo no desenvolvimento celular (Silva et al., 2024).

Já é estudado que os embriões humanos pré-implantados secretam IL-10 (Oezoernek et al., 1995). Apesar dos mecanismos de sinalização da citocina IL-10 não serem totalmente conhecidos, a IL-10 amortece os efeitos inflamatórios de citocinas pró-inflamatórias em infecções graves, que podem levar a danos ainda mais intensos a outros tecidos. Além disso, essa citocina está associada à sobrevivência, proliferação e atividades antiapoptóticas de vários tipos de cânceres, por exemplo (Verma et al., 2016).

Estudos demonstram o aumento na produção de IL-10, logo após a implantação, sendo significativo em mulheres com gestações bem-sucedidas em comparação às mulheres que apresentaram aborto (Wu et al., 2001). Também é relatado que a IL-10 desempenha um papel crucial no sucesso da gravidez e a sua deficiência contribui para infertilidade, aborto espontâneo e distúrbios hipertensivos da gravidez (Chatterjee et al., 2014).

Diante do exposto, considerando a hipótese de que a IL-10 favorece a competência oocitária após a refrigeração de ovários e complexos cúmulo-oócitos bovinos a 4 °C por três horas, objetivou-se avaliar os efeitos da IL-10 na prevenção e reversão da inflamação em oócitos bovinos submetidos a refrigeração *in vitro*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar os efeitos da citocina anti-inflamatória IL-10 sobre a competência oocitária após a refrigeração a 4° C de ovários e complexos cumulus-oócitos durante o período de três horas *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar os efeitos oriundos da IL-10 sobre a fragmentação nuclear de oócitos e de células do complexo cumulus-oócitos refrigerados ou recuperados de ovários refrigerados a 4 °C.
- Avaliar os efeitos da IL-10 na expansão das células do cumulus, e maturação nuclear e citoplasmática de oócitos de complexos cumulus-oócitos refrigerados ou recuperados de ovários refrigerados a 4 °C.

3 METODOLOGIA

Com o objetivo de investigar se a IL-10 favorece a competência oocitária após a refrigeração de ovários e complexos cumulus-oócitos bovinos a 4 °C, foram conduzidos dois experimentos.

3.1 COLETA, PROCESSAMENTO E MATURAÇÃO *IN VITRO* DOS COMPLEXOS CUMULUS-OÓCITO

Para obtenção dos complexos cumulus-oócitos (CCOs), foram utilizados ovários bovinos, majoritariamente compostos da raça Nelore, provenientes de abatedouro na região de São Carlos - SP, os quais foram coletados e transportados até o laboratório em solução fisiológica de NaCl, em temperatura de 4 °C ou 30 °C. Os folículos ovarianos com tamanho de 3 a 6 mm foram aspirados com agulha acopladas a seringa de 10 mL e o fluido folicular foi transferido para um tubo falcon de 15 mL, mantido a 38 °C durante 20 minutos para que ocorresse a sedimentação.

Em seguida, o sobrenadante foi descartado e a fração sedimentada contendo os CCOs foi transferida para uma placa de petri de 100 mm riscada contendo solução de lavagem (PBS suplementado com 10% de soro fetal bovino - SFB) aquecida a 38 °C. O rastreamento foi realizado em estereomicroscópio, os CCOs homogêneos e com ao menos três camadas de células do cumulus foram selecionados e transferidos para o meio de manutenção (TCM 199 Hepes suplementado com 10% de SFB, 50 µg/mL de sulfato de estreptomicina e 50 µl/mL de penicilina), lavados, consecutivamente, em três gotas de 100 µL de meio de maturação *in vitro* (MIV), composto de meio de cultura de tecidos 199 (TCM 199) com sais de Earle (Gibco) e L-glutamina, suplementado com 10% (v/v) de SFB (Gibco), 0,2 mM piruvato sódico, 1,0 µg/mL de hormônio folículo estimulante (Folltropin; Bioniche Co., Lavaltrie, Canada), 2 µg/mL de estradiol (Sigma), 50 µg/mL de sulfato de estreptomicina e 50 µl/mL de penicilina, e destinados aos seus tratamentos, conforme Experimento I e Experimento II, descritos adiante, para serem incubados.

Para o grupo dos CCOs refrigerados do Experimento II, após a seleção e lavagem, os CCOs foram transferidos para o meio de refrigeração (TCM 199 Hepes

suplementado com 50% SFB), suplementado ou não com 50 ng/mL de IL-10, e foram refrigerados a 4 °C em geladeira por 3h. Na sequência, os CCOs foram lavados em outras três gotas de 100 µL do meio de MIV e foram transferidos para seus respectivos grupos para serem incubados.

Ao todo, foram executadas 12 rodadas de coleta, processamento e MIV de 1500 a 1600 CCOs, sendo 06 rotinas para cada experimento, para obter um número amostral final de 20 a 30 oócitos por grupo em cada ensaio analítico para os experimentos I e II.

3.2 EXPERIMENTO I - Efeito da Interleucina-10 (IL-10) nos complexos cumulus-oócitos recuperados de ovários refrigerados.

Para execução deste experimento (figura 2), foram utilizados complexos cumulus-oócitos (CCOs) recuperados de folículos de 3-6 mm de diâmetro de ovários bovino de abatedouro refrigerados a 4 °C ou não, e foram aleatoriamente distribuídos nos quatro grupos de tratamento seguintes:

- **G1 - Aquecido controle-placebo:** Oócitos recuperados de ovários não refrigerados mantidos a 30 °C durante 3h e transferidos para o meio de maturação *in vitro* (MIV).
- **G2 - Aquecido IL-10:** Oócitos recuperados de ovários não refrigerados mantidos a 30 °C durante 3h e transferidos para o meio MIV suplementado com 100 ng/mL de IL-10.
- **G3 - Refrigerado controle-placebo:** Oócitos recuperados de ovários refrigerados a 4 °C durante um período de 3h e transferidos para o meio MIV.
- **G4 - Refrigerado IL-10:** Oócitos recuperados de ovários refrigerados a 4 °C durante um período de 3h e transferidos para o meio MIV suplementado com 100 ng/mL de IL-10.

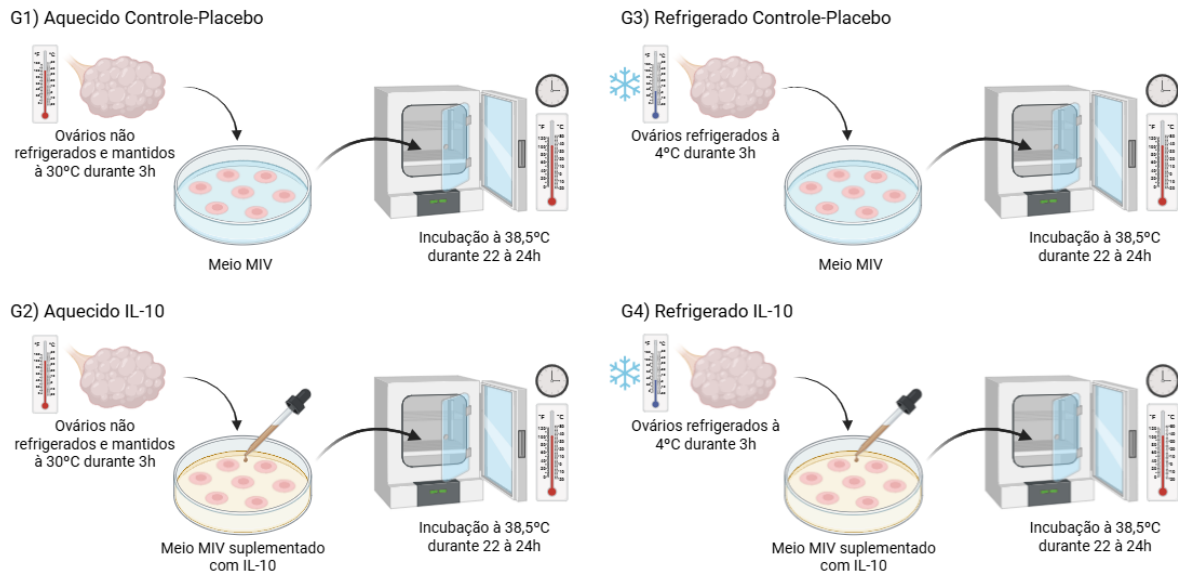


Figura 2 - Delineamento do Experimento I: Efeito da IL-10 nos complexos cumulus-oócitos recuperados de ovários refrigerados.

3.3 EXPERIMENTO II - Efeito da IL-10 nos complexos cumulus-oócitos durante a refrigeração.

Para a realização deste experimento (figura 3), os CCOs utilizados foram recuperados da mesma forma que o Experimento I e foram aleatoriamente distribuídos nos cinco grupos seguintes:

- **G1 - Aquecido controle-placebo:** CCOs recuperados de ovários e transferidos para o meio MIV.
- **G2 - Aquecido IL-10:** CCOs recuperados de ovários e transferidos para o meio MIV suplementado com 50 ng/mL de IL-10 (Zhao et al., 2013).
- **G3 - Refrigerado controle-placebo:** CCOs recuperados de ovários, transferidos para o meio de refrigeração a 4 °C durante um período de 3h e, em seguida, transferidos para o meio MIV.
- **G4 - Refrigerado IL-10 prevenção:** CCOs recuperados de ovários, transferidos para o meio de refrigeração suplementado com 50 ng/mL de IL-10 a 4 °C durante um período de 3h e, em seguida, transferidos para o meio MIV.
- **G5 - Refrigerado IL-10 reversão:** CCOs recuperados de ovários, transferidos para o meio de refrigeração a 4 °C durante um período de 3h e, em seguida, transferidos para o meio MIV suplementado com 50 ng/mL de IL-10.

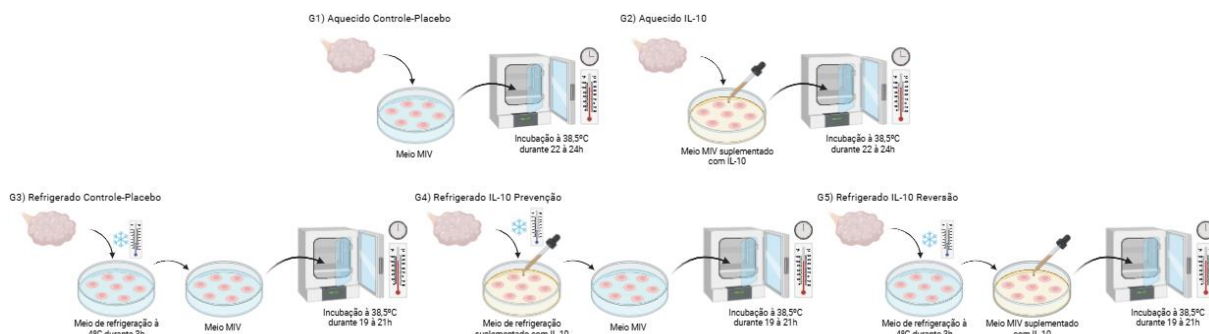


Figura 3 - Delineamento do Experimento II: Efeito da IL-10 nos complexos cumulus-oócitos durante a refrigeração.

Para a MIV, nos experimentos I e II, os CCOs foram distribuídos em grupos de 20 a 25 estruturas por gota de 90 μ L de meio MIV, conforme seus tratamentos, em placas de Petri de 35 mm cobertas com óleo mineral, e incubados a 38,5 °C em atmosfera de 5% de CO₂ e umidade saturada por 22h a 24h.

3.4 ENSAIOS ANALÍTICOS

3.4.1 Expansão dos Complexos Cumulus-Oócitos

A avaliação da expansão das células do cumulus foi realizada utilizando-se grupos formados por oito CCOs em estereomicroscópio com câmera. Foram registradas imagens antes e após o período de maturação *in vitro* (MIV), as quais foram utilizadas para quantificação da área das células do cumulus com o auxílio do software Image J, a qual foi expressa em unidades arbitrárias. A expansão das células do cumulus foi determinada pela razão entre as áreas medidas após e antes da MIV.

3.4.2 Maturação Nuclear - Análise da Extrusão do Corpúsculo Polar

Após o período de MIV, os CCOs foram coletados durante as réplicas do experimento e foram desnudos com sucessivas pipetagens em um tubo eppendorf contendo 50 μ L hialuronidase (1 mg/mL) para assegurar a plena remoção das células do cumulus.

Os oócitos desnudos foram lavados em 3 gotas de 100 μ L de solução de bloqueio (0,5% BSA em PBS) durante 3 minutos. As células do cumulus (CC) obtidas

pelo desnudamento e lavagem foram recuperadas e reservadas para serem, posteriormente, submetidas à análise da fragmentação de DNA pela técnica de TUNEL (item 3.4.5.). Posteriormente, os oócitos foram fixados em uma gota de 100 µL de paraformaldeído 4% durante 30 minutos em temperatura ambiente

Após a fixação, os oócitos foram lavados em 3 gotas de 100 µL de PBS/PVP 0,2% e submetidos à avaliação por meio de visualização em microscópio equipado com contraste Emboss. Os oócitos que experimentaram a anáfase I, possíveis de serem identificados através da formação e compactação do primeiro corpúsculo polar (CP), foram considerados como maduros. A porcentagem de oócitos maduros por grupo foi considerada como a taxa de maturação nuclear.

3.4.3 Fragmentação DNA dos Oócitos - TUNEL

Os oócitos, depois de desnudos e lavados, foram fixados em paraformaldeído 4% durante 30 minutos em temperatura ambiente. Após esse processo, os mesmos foram armazenados em 1 mL de solução de PBS/PVP 0,2% na geladeira. No dia em que foi realizada a análise de TUNEL, os oócitos foram resgatados e lavados em 3 gotas de 100 µl da Solução de Lavagem 0,1% PBS/PVP, por 2 minutos em cada gota. Após a lavagem, os oócitos foram permeabilizados em solução 0,5% de triton 100X, acrescido de 0,1% citrato de sódio em PBS, durante 1 hora em placas de 4 poços em câmara escura e úmida em temperatura ambiente.

Depois da permeabilização, os oócitos foram lavados em 3 gotas de 100 µl da solução de lavagem 0,1% PBS/PVP. Após lavagem, as amostras foram incubadas em microgotas da mistura de reagentes da técnica de TUNEL - Kit in Situ Cell Death Detection Kit Fluorescein (Roche®, Alemanha), contendo a proporção de 10% de solução enzimática (enzima terminal deoxinucleotídeo transferase) com 90% de solução marcadora (conjugado fluorescente de dUTP) por 1 hora à temperatura ambiente no escuro, em câmara úmida.

Em seguida, as amostras foram lavadas em 3 gotas de 100 µl da solução de lavagem 0,1% PBS/PVP e foram submetidas a um contraste para visualização do

DNA com solução de Hoechst 33342 (concentração final 10 µg/µL) em glicerol e em uma lâmina histológica por 15 minutos.

Após a coloração com a solução de Hoechst 33342, os oócitos foram analisados em microscópio de fluorescência equipado com sistema de captura de imagem. Desta forma, as células que apresentaram o núcleo com marcação verde (sonda FITC) foram consideradas como as células TUNEL positivas, ou seja, apresentaram o DNA fragmentado. As células que apresentaram coloração azul (sonda Hoechst 33342) indicaram a localização do núcleo que possui DNA intacto (figura 7).

3.4.4 Maturação Citoplasmática - Avaliação da Distribuição dos Grânulos Corticais

A maturação citoplasmática foi avaliada de acordo com a distribuição dos grânulos corticais (GCs) (Pang et al., 2017). Os oócitos desnudos e lavados foram transferidos para solução ácida de Tyrode para remoção da zona pelúcida sob monitoramento com estereomicroscópio, por aproximadamente 5 minutos.

Os oócitos, com a zona pelúcida removida, foram rapidamente lavados em 3 gotas de 100 µl solução de bloqueio (0,5% BSA em PBS) durante 3 minutos, e fixados em paraformaldeído 4% durante 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, os oócitos foram lavados novamente em mais três gotas de solução de bloqueio PBS/BSA 0,5% e em seguida permeabilizados em solução 0,1% de triton 100X acrescido de 0,1% citrato de sódio em PBS, durante 15 minutos, em placas de 4 poços.

Após a permeabilização, os oócitos foram lavados em três gotas de solução de bloqueio PBS/BSA 0,5% por 3 minutos e transferidos para uma gota de 50 µl de FITC 20 µg/mL conjugado com *Lens culinaris* aglutinina durante 30 minutos em câmara escura e úmida em temperatura ambiente. Por fim, os oócitos foram lavados mais três vezes em PBS/BSA e finalmente avaliados em microscópio de fluorescência equipado com sistema de captura de imagem.

O padrão de distribuição dos grânulos corticais (GCs) foi registrado como:

- I. **Periférico:** GCs distribuídos adjacentes à membrana plasmática e definidos como oócitos apresentando maturação citoplasmática;
- II. **Cortical:** A maioria dos GCs localizados na região cortical e definidos como oócitos parcialmente maduros;
- III. **Homogêneo:** GCs espalhados por todo o citoplasma e definidos como oócitos com citoplasma imaturo;
- IV. **Agrupado:** Grandes agregados de GCs distribuídos no citoplasma e definidos como oócitos degenerados.

Os oócitos que apresentaram o padrão de distribuição dos GCs periférico (i) e cortical (ii) foram utilizados para o cálculo da proporção de oócitos apresentando citoplasma maturo (figura 8).

3.4.5 Fragmentação DNA das Células do Cumulus – TUNEL

As células do cumulus (CCs) reservadas (item 3.4.2.) foram utilizadas para essa análise. Após o desnudamento e isolamento das CCs dos CCOs, essas células foram centrifugadas, 400 g por 3 minutos, em eppendorf de 0,2 mL contendo a solução de hialuronidase.

Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as CCs foram ressuspensas em 100 µL em solução de lavagem PBS/BSA (0,5%) e foram novamente centrifugadas por 3 minutos em 400 g. Ao final da segunda centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram fixadas com 100 µL de paraformaldeído (4%) para posterior armazenamento a 4-8 °C até o uso.

Desta forma, quando realizou-se a análise, as células foram centrifugadas no eppendorf de armazenamento contendo paraformaldeído em 400 g por 3 minutos e o pellet formado foi transferido para outro tubo e ressuspensado em 100 µL da solução de lavagem 0,1% PVP/PBS. Após a lavagem, as células foram novamente centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, permeabilizou-se as CCs com a solução permeabilizadora (0,5% Triton 100X acrescido de 0,1% citrato de sódio em PBS) por 1 hora em eppendorf em câmara úmida à temperatura ambiente.

Posteriormente, centrifugou-se mais uma vez as células em mesmo tempo e velocidade, o sobrenadante foi descartado, e as células foram mais uma vez ressuspensas em 100 µL da solução de lavagem 0,1% PVP/PBS e centrifugadas. A fragmentação do DNA foi avaliada utilizando a técnica de TUNEL - In Situ Cell Death Detection Kit Fluorescein (Roche®, Alemanha), tal como descrito anteriormente (item 3.4.3), com auxílio do microscópio de fluorescência equipado com sistema de captura de imagem. As CCs que apresentaram o núcleo com marcação verde (sonda FITC) foram consideradas as células TUNEL positivas, ou seja, apresentaram o DNA fragmentado. A coloração apenas azul (sonda Hoechst 33342) indicou a localização do núcleo das CC que possui DNA intacto.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística, foi realizado o procedimento GLIMMIX (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA), para análise de variância (ANOVA) pelo método dos quadrados mínimos, e o procedimento LOGISTIC (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA), para análise de regressão logística utilizando o link logit. Quando aplicável, fontes de variação nos modelos incluindo tratamento, refrigeração, e interação de primeira ordem foram considerados efeitos fixos e a réplica foi considerada como efeito aleatório. Os dados foram expressos em porcentagem ou média \pm erro padrão. Foi adotado o valor de $P < 0,05$ para significância estatística.

4 RESULTADOS

4.1 EXPANSÃO DOS COMPLEXOS CUMULUS-OÓCITOS

Após a maturação *in vitro* (figura 4), a expansão das células do cumulus foi claramente observada em todos os casos e tratamentos. Os resultados e análises estatísticas não revelaram um efeito significativo da IL-10 e da refrigeração na expansão das células do cumulus. Em ambos os experimentos, as áreas das células do cumulus antes e depois da MIV não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Desta forma, a expansão das células do cumulus não foi influenciada em função da refrigeração ou da utilização de IL-10 em ambos os experimentos (figura 5).

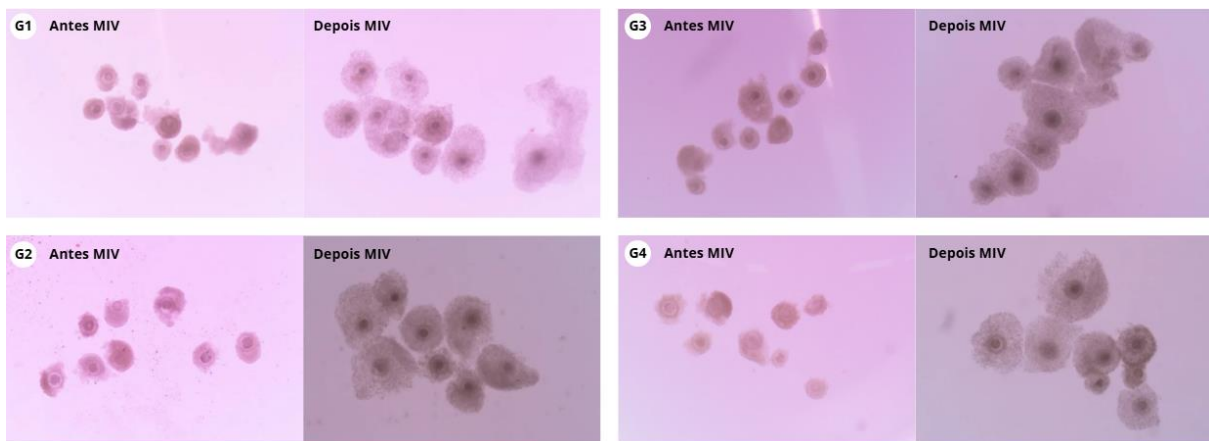
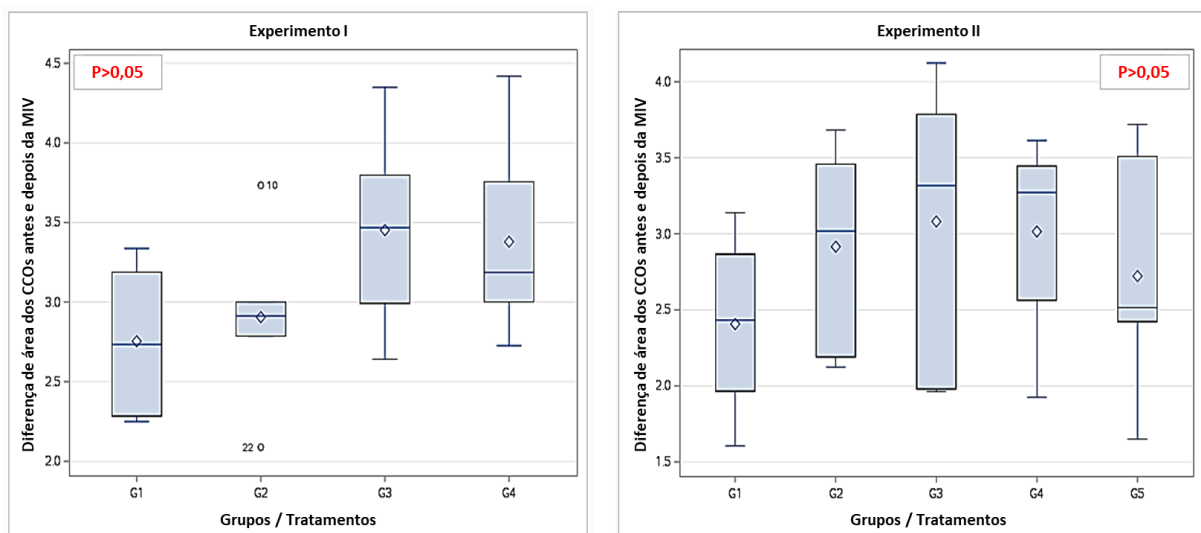


Figura 4 - Expansão das CCs antes e depois da MIV do Experimento I. – Aumento de 80x.



Legenda: ○ Outlier (Valor discrepante); ◇ Média; — Mediana.

Figura 5 - Efeito da IL-10 e da refrigeração na expansão das células do cumulus após 22h de MIV.

*Foram utilizadas em média 432 CCOs nos dois experimentos desse estudo, divididas em 48 CCOs por grupo analisado em cada experimento.

**Nenhum efeito do tratamento ($P > 0,05$) foi observado para cada um dos grupos avaliados.

4.2 MATURAÇÃO NUCLEAR - ANÁLISE DA EXTRUSÃO DO CORPÚSCULO POLAR

No Experimento I, os resultados apontam uma redução significativa ($P < 0,05$) da maturação nuclear dos oócitos no tratamento refrigerado controle (G3) em comparação com os outros tratamentos, conforme indicado na tabela 1. Além do mais, o grupo Refrigerado IL-10 (G4) apresentou o mesmo comportamento de maturação, quando comparado, estatisticamente, com os dois grupos aquecidos. A análise indica que a IL-10 desempenhou um papel crucial e efetivo no resgate da maturação nuclear dos oócitos submetidos à refrigeração.

Experimento I: Extrusão do corpúsculo polar dos oócitos	
Tratamentos	Extrusão do Corpúsculo Polar (%)
Aquecido Controle	$41,3 \pm 6,3^a$
Aquecido IL-10	$48,0 \pm 3,1^a$
Refrigerado Controle	$23,3 \pm 3,0^b$
Refrigerado IL-10	$39,6 \pm 4,4^a$

^{ab} Letras minúsculas incomuns na mesma coluna diferem estatisticamente.

Tabela 1 - Maturação nuclear (%) do Experimento I avaliada por meio da extrusão do primeiro corpúsculo polar.

Os resultados do Experimento II apresentaram uma diferença significativa entre os tratamentos que foram refrigerados e os tratamentos aquecidos de forma abrangente, conforme demonstrado na tabela 2. Uma maior taxa de extrusão do corpúsculo polar (CP) (figura 6) foi observada para os tratamentos dos grupos aquecidos em comparação àqueles refrigerados, no entanto, quando comparados os tratamentos pertencentes a diferentes grupos, nenhum efeito foi observado entre eles ($P > 0,05$) independente se aquecido ou refrigerado, demonstrando uma ausência de efeito da IL-10 na extrusão do CP.

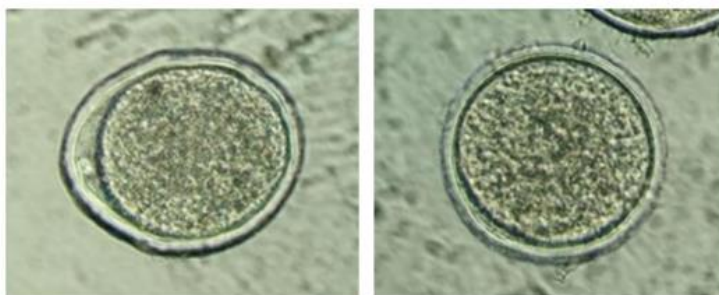


Figura 6 - Extrusão do primeiro CP. Esquerda: Oócito maturo após 22h com a visualização do primeiro CP; Direita: Oócito não maturo após 22h, em que não apresenta a presença do primeiro CP.

Experimento II: Extrusão do corpúsculo polar dos oócitos	
Tratamentos	Extrusão do Corpúsculo Polar (%)
Aquecido Controle	33,4 ± 3,5 ^a
Aquecido IL-10	33,8 ± 5,5 ^a
Refrigerado Controle	14,2 ± 5,9 ^b
Refrigerado IL-10 Prevenção	18,5 ± 3,8 ^b
Refrigerado IL-10 Reversão	14,6 ± 3,7 ^b

^{ab} Letras minúsculas incomuns na mesma coluna diferem estatisticamente.

Tabela 2 - Maturação nuclear (%) do Experimento II avaliada por meio da extrusão do primeiro corpúsculo polar.

4.3 FRAGMENTAÇÃO DNA DOS OÓCITOS - TUNEL

No Experimento I, os resultados mostraram diferenças significativas na fragmentação do DNA entre os diversos tratamentos, conforme ilustrado na tabela 3. O tratamento aquecido com IL-10 foi similar ($P>0,05$) ao refrigerado IL-10, ademais, apresentou numericamente a menor porcentagem de DNA fragmentado em comparação aos demais tratamentos, o que indica uma proteção efetiva da IL-10 contra danos ao DNA. Em contraste, o tratamento refrigerado controle apresentou numericamente a maior porcentagem de DNA fragmentado, mas diferiu ($P<0,05$) somente do grupo Aquecido IL-10.

Experimento I: DNA fragmentado dos oócitos	
Tratamentos	DNA fragmentado (%)
Aquecido Controle	13,3 (4/30) ^{ab}
Aquecido IL-10	8,3 (2/24) ^b
Refrigerado Controle	34,5 (10/29) ^a
Refrigerado IL-10	22,2 (6/27) ^{ab}

^{ab} Letras minúsculas incomuns na mesma coluna diferem estatisticamente.

Tabela 3 - Porcentagem de fragmentação do DNA dos oócitos (Experimento I).

No Experimento II, os resultados revelaram um padrão semelhante ao Experimento I, conforme mostrado na tabela 4. O grupo aquecido com IL-10 apresentou numericamente a menor porcentagem de DNA fragmentado entre todos os grupos analisados. Por outro lado, o tratamento refrigerado controle exibiu numericamente a maior porcentagem de DNA fragmentado, contudo, somente os grupos Aquecido IL-10 e Refrigerado controle diferiram ($P<0,05$) entre si, confirmando a expectativa de que a refrigeração causa estresse térmico e danos ao DNA. Os

resultados também mostraram que os grupos refrigerados tratados com IL-10, tanto para prevenção quanto reversão, apresentaram porcentagens de DNA fragmentado muito semelhantes ($P>0,05$) ao grupo aquecido controle.

Experimento II: DNA fragmentado dos oócitos	
Tratamentos	DNA fragmentado (%)
Aquecido Controle	32,0 (8/25) ^{ab}
Aquecido IL-10	20,7 (6/29) ^a
Refrigerado Controle	50,0 (14/28) ^b
Refrigerado IL-10 Prevenção	32,1 (9/28) ^{ab}
Refrigerado IL-10 Reversão	31,3 (10/32) ^{ab}

^{ab} Letras minúsculas incomuns na mesma coluna diferem estatisticamente.

Tabela 4 - Porcentagem de fragmentação do DNA dos oócitos (Experimento II).

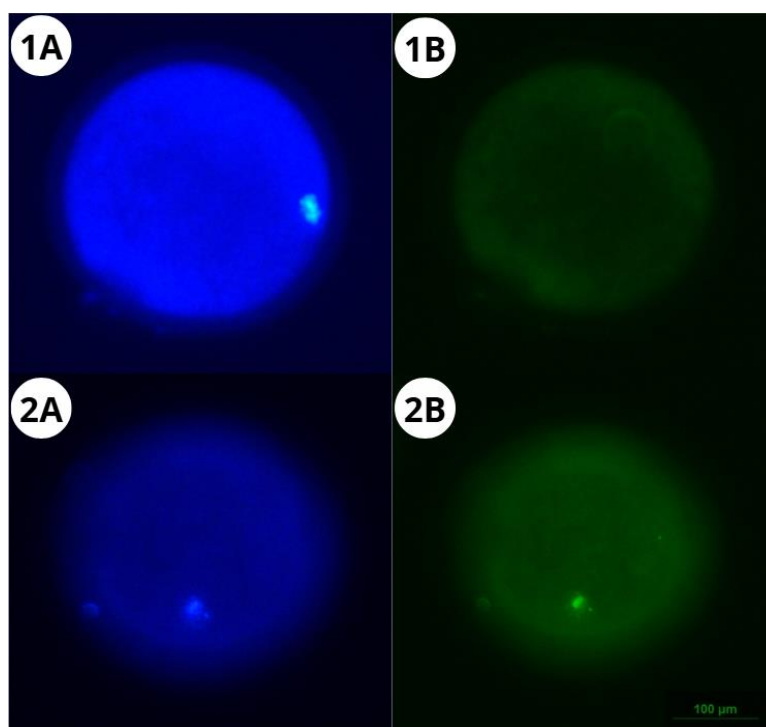


Figura 7 - Análise TUNEL para avaliação da fragmentação do DNA dos oócitos. Célula 1 (A e B): TUNEL Negativo; Célula 2 (A e B): TUNEL Positivo.

4.4 MATURAÇÃO CITOPLASMÁTICA - AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS GRÂNULOS CORTICAIS

No Experimento I, os dados revelaram que o padrão de distribuição homogêneo dos GCs foi o mais predominante em todos os grupos analisados, conforme mostrado na tabela 5. No entanto, observou-se que o perfil agrupado apareceu com maior

frequência nos grupos refrigerados em comparação aos aquecidos. Esse padrão de agrupamento de grandes agregados de GCs distribuídos no citoplasma indica um estado degenerado dos oócitos.

Experimento I: Distribuição morfoespacial dos grânulos corticais dos oócitos (%).

Distribuição Grânulos	Tratamentos			
	Aquecido Controle	Aquecido IL-10	Refrigerado Controle	Refrigerado IL-10
Periférico	3,5 (1/29) ^{aA}	11,1 (4/36) ^{aAB}	3,5 (1/29) ^{aA}	4,2 (1/24) ^{aB}
Cortical	31,0 (9/29) ^{aBC}	27,8 (10/36) ^{aB}	13,8 (4/29) ^{aAB}	33,3 (8/24) ^{aA}
Homogêneo	55,2 (16/29) ^{abC}	55,6 (20/36) ^{aC}	55,2 (16/29) ^{abC}	29,2 (7/24) ^{bA}
Agrupado	10,3 (3/29) ^{acAB}	5,6 (2/36) ^{aA}	27,6 (8/29) ^{bcB}	33,3 (8/24) ^{bA}

^{ab} Letras minúsculas incomuns na mesma linha diferem estatisticamente entre os tratamentos.

^{AB} Letras maiúsculas incomuns na mesma coluna diferem estatisticamente entre as distribuições dos grânulos corticais.

Tabela 5 - Maturação citoplasmática (Experimento I), distribuição morfoespacial dos GCs dos oócitos.

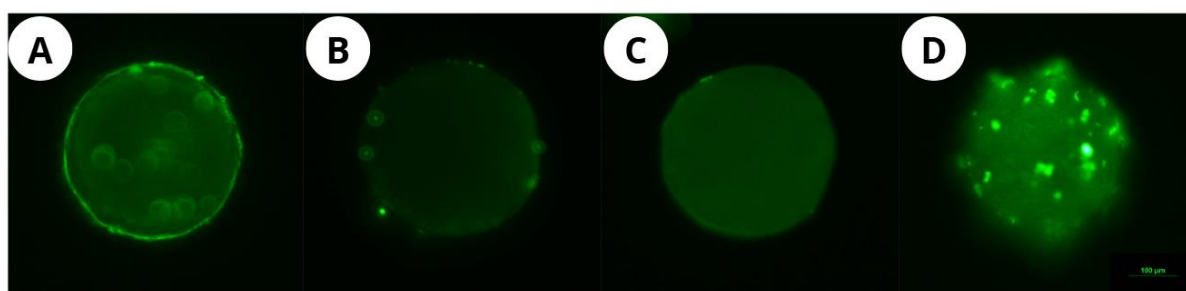


Figura 8 - Classificação da distribuição morfoespacial dos grânulos corticais (GCs) dos oócitos.
A) Periférico, B) Cortical; C) Homogêneo; D) Agrupado.

Os resultados do Experimento II mostraram que os tratamentos refrigerados, mesmo quando expostos a IL-10, apresentaram uma maturação citoplasmática limitada, conforme ilustrado na tabela 6. Para estes tratamentos, os padrões predominantes na distribuição dos grânulos corticais foram os perfis homogêneo e, mais intensamente, o agrupado nesses dois grupos. Conforme ilustrado na tabela 6, a maioria dos oócitos dos tratamentos aquecidos exibiram citoplasma imaturo, já os tratamentos refrigerados, a maior parte são de perfil agrupado. Enquanto os grupos homogêneos se diferiram significativamente dos demais, nos oócitos aquecidos, não houve diferença significativa entre os padrões homogêneo e agrupado nos grupos refrigerados.

Experimento II: Distribuição morfoespacial dos grânulos corticais dos oócitos (%).

Distribuição Grânulos	Tratamentos				
	Aquecido Controle	Aquecido IL-10	Refrigerado Controle	Refrigerado IL-10 Prevenção	Refrigerado IL-10 Reversão
Periférico	0,0 (0/27) ^{aA}	18,2 (4/22) ^{aA}	3,6 (1/28) ^{aA}	0,0 (0/27) ^{aA}	0,0 (0/23) ^{aA}
Cortical	7,4 (2/27) ^{aA}	18,2 (4/22) ^{aA}	14,3 (4/28) ^{aA}	3,7 (1/27) ^{aA}	0,0 (0/23) ^{aA}
Homogêneo	92,6 (25/27) ^{aB}	54,6 (12/22) ^{bB}	39,3 (11/28) ^{bB}	37,0 (10/27) ^{bB}	39,1 (9/23) ^{bB}
Agrupado	0,0 (0/27) ^{aA}	9,1 (2/22) ^{aA}	42,9 (12/28) ^{bB}	59,3 (16/27) ^{bB}	60,9 (14/23) ^{bB}

^{ab} Letras minúsculas incomuns na mesma linha diferem entre os tratamentos.

^{AB} Letras maiúsculas incomuns na mesma coluna diferem entre as distribuições dos grânulos corticais.

Tabela 6 - Maturação citoplasmática (Experimento II), distribuição morfoespacial dos GCs dos oócitos.

4.5 FRAGMENTAÇÃO DNA DAS CÉLULAS DO CUMULUS – TUNEL

Em ambos experimentos, um mínimo de 500 CCs foram contadas de cada grupo de tratamento para que fosse realizado os cálculos estatísticos em porcentagem (figura 10). Os resultados dos experimentos não revelaram efeitos ($P > 0,05$) da IL-10 e da refrigeração sobre a fragmentação do DNA das células do cumulus, conforme demonstrado na figura 9. A porcentagem média de DNA fragmentado foi semelhante ($P > 0,05$) entre todos os grupos experimentais, sem diferenças notáveis entre os tratamentos com IL-10 e os controles, tanto para condições refrigeradas quanto aquecidas.

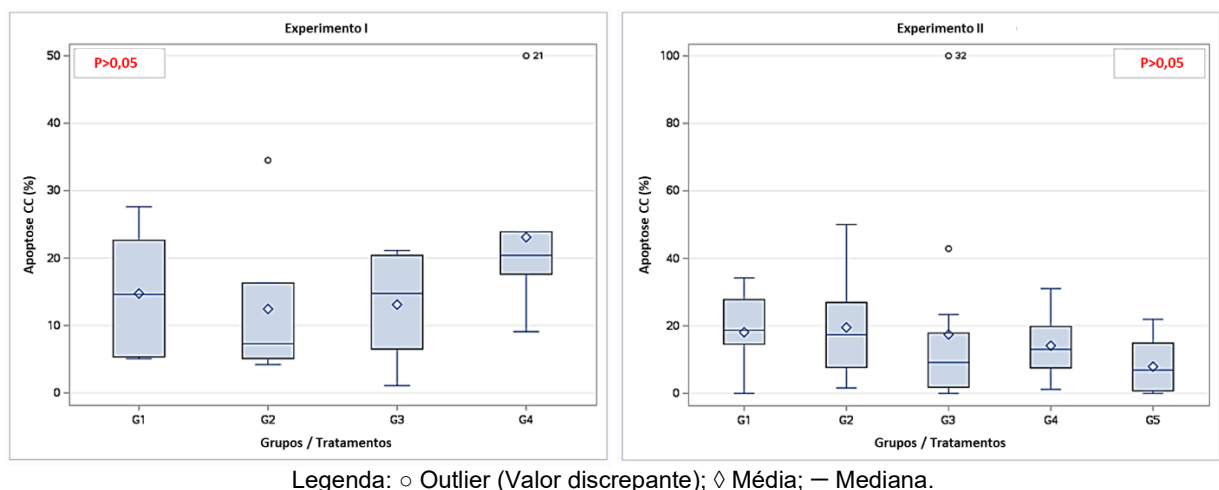


Figura 9 - Efeito de IL-10 e da refrigeração sobre a apoptose das CCs em porcentagem.

*Em ambos os experimentos, foram utilizadas uma média de 500 a 650 CCs em cada grupo analisado.

**Nenhum efeito do tratamento ($P > 0,05$) foi observado para cada grupo avaliado.

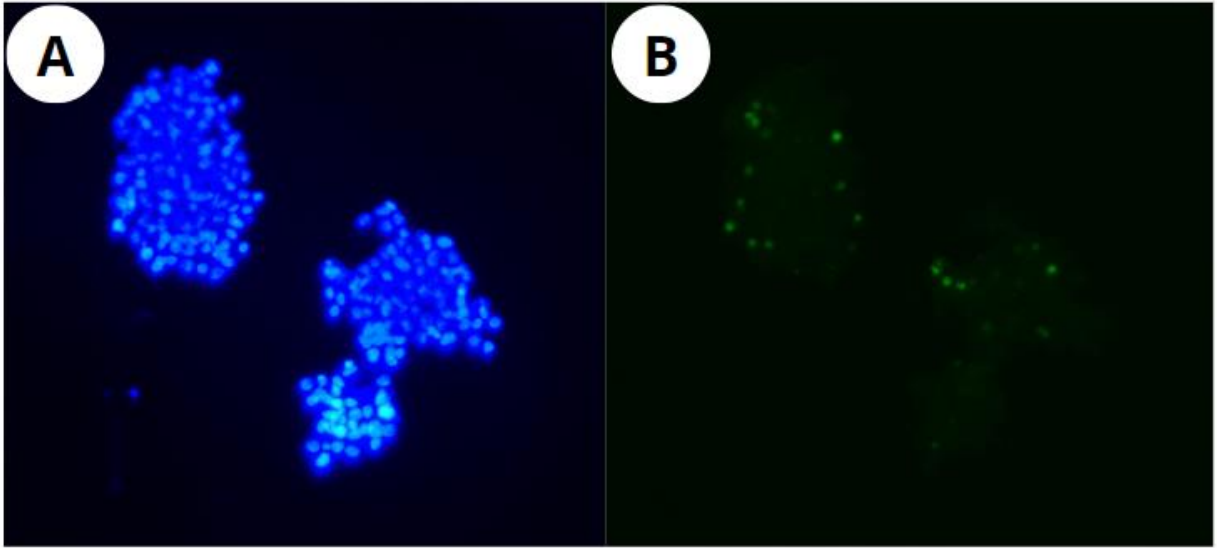


Figura 10 - Análise TUNEL para avaliação da fragmentação do DNA das CCs.
A) CCs marcadas com a sonda Célula Hoechst 33342 indicando a localização do núcleo; B) CCs TUNEL positivas em verde indicando fragmentação do DNA. – Aumento de 200x.

5 DISCUSSÃO

Embriões produzidos *in vitro*, normalmente, possuem menor capacidade de desenvolvimento quando comparados a embriões produzidos *in vivo* (Van Wagendonk-De Leeuw et al., 2000). A média percentual é de que 30% a 40% dos oócitos bovinos, submetidos ao processo de PIV, conseguem se desenvolver até o estágio de blastocisto (Chandra e Sharma, 2020).

Em geral, existem duas possíveis explicações para justificar a baixa competência dos oócitos *in vitro* em relação aos oócitos *in vivo*, a primeira diz respeito às condições de cultivo durante as etapas *in vitro*, a segunda aponta a competência intrínseca inicial do oócito (Sirard e Blondin, 1996). Para obter sucesso no desenvolvimento, o embrião necessita que os processos de maturação nuclear, citoplasmática e molecular do oócito estejam em excelentes condições (Sirard et al., 2006) sendo estes processos fundamentalmente relacionados ao ambiente ao qual estes gametas foram inseridos (Hoelker et al., 2014).

No Experimento I, os resultados obtidos demonstraram que a utilização da IL-10 na dose de 100 ng/ml favoreceu a maturação nuclear de oócitos submetidos à refrigeração visto que a extrusão do corpúsculo polar neste tratamento foi similar à dos tratamentos de oócitos mantidos em temperaturas de cultivo. Sabe-se que o principal fator da perda de qualidade dos oócitos é a redução do fornecimento de oxigênio para as células por causa da oclusão do fluxo sanguíneo, ocasionando uma mudança do metabolismo aeróbico para anaeróbico, e resultando na fermentação láctica para produção de energia e acúmulo de ácido láctico no interior da célula (Wongsrikeao et al., 2005). Para evitar, então, essas perdas na qualidade de oócitos, o armazenamento refrigerado dos ovários diminui o estresse dos oócitos antes da cultura de maturação, retardando assim o acúmulo de subprodutos ácidos no interior da célula e prolongando a viabilidade dos oócitos (Luu et al., 2014). Ainda, é sabido que a IL-10 possui propriedades anti-inflamatórias e que atua na proteção tecidual e respectiva regeneração (Moore et al., 2021; Hortal et al., 2023). Neste sentido, é possível inferir que o emprego da IL-10 no meio MIV, na dose de 100 ng/ml, foi capaz de atuar na manutenção da atividade biológica de oócitos quando os ovários foram submetidos ao transporte refrigerado. Em contrapartida, o mesmo efeito não foi observado no Experimento II, no qual é possível verificar que os tratamentos

refrigerados, apesar de serem similares entre si, são inferiores aos oócitos dos tratamentos do grupo aquecido, os quais também são similares entre si. É possível especular que tal efeito tenha decorrido em função da utilização de uma dose menor, a qual correspondia a 50 ng/ml, visto que a redução na expressão de fatores anti-inflamatórios, como a IL-10, pode resultar em resposta inflamatória, acarretando um atraso na maturação folicular decorrente de uma alteração na síntese de hormônios esteróides (Xie et al., 2023).

No Experimento II, os resultados demonstraram que os oócitos refrigerados tratados com 50 ng/ml de IL-10 tiveram uma fragmentação do DNA nuclear semelhante aos oócitos do tratamento controle mantidos em temperatura de cultivo. Tais resultados demonstram uma proteção da IL-10 contra a fragmentação do DNA para oócitos refrigerados, proporcionando resultados semelhantes àqueles observados para oócitos mantidos em temperatura de cultivo. Em humanos, a IL-10 é secretada por embriões pré-implantados em altos níveis nos tecidos placentários e atua na inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias produzidas pelas células Th1, como a IL-2 e IFN- γ , que auxiliam na imunidade mediada por macrófagos e células T citotóxica (Oezzoernek et al., 1995).

Avaliando a fragmentação do DNA dos oócitos, nota-se um mesmo padrão de comportamento nos experimentos I e II. Os tratamentos com utilização de IL-10 apresentaram similaridade aos oócitos do tratamento controle mantidos em temperatura de cultivo e a menor fragmentação foi obtida para os tratamentos aquecidos com adição de IL-10, entretanto, esta foi significativa apenas para o Experimento I, o qual utilizou uma concentração de 100 ng/ml. Estudos que avaliaram a IL-6 mostram que, ao realizar cultivo com concentração de 100 ng/mL (Seekford et al., 2021), é obtido um aumento consistente no número das células de massa celular interna (MCI), diferentemente de outros trabalhos que não conseguiram detectar aumentos nos números de MCI, utilizando uma suplementação de IL-6 nas concentrações de 0,5 e 50 ng/mL (Sang et al., 2020). O estresse térmico do calor causa danos significativos ao DNA e nas modificações epigenéticas, estando assim relacionado à capacidade de desenvolvimento do oócito, reduzindo a taxa de clivagem, a taxa de blastocisto e o número de cópias de DNA mitocondrial (Feng et al., 2024). A eficácia da IL-10 em mitigar os danos ao DNA em oócitos sob estresse térmico, tanto em condições de aquecimento quanto de refrigeração, sublinha a

importância da investigação do papel desta citocina na preservação da integridade celular.

Em ambos os experimentos, a maturação citoplasmática apresentou uma tendência à não-maturação e à degradação celular nos grupos submetidos à refrigeração. Tais resultados demonstram que a intervenção com IL-10 não conseguiu estabilizar a qualidade citoplasmática prejudicada dos oócitos expostos ao frio. A maturação citoplasmática do oócito é altamente importante para a aquisição de competência de desenvolvimento, pois há um rearranjo substancial de organelas coordenadas pelo citoesqueleto (Coticchio et al., 2015) e danos nessas estruturas comprometem os grânulos corticais (Payton et al., 2004; Moura e Paula-Lopes, 2020). Avaliando o agrupamento dos GCs, pode-se sugerir que a refrigeração induz um estresse significativo levando à formação de clusters, impedindo a migração dos GCs em direção ao oolema durante a maturação, indicando a degeneração celular. Esse comportamento é relatado diferentemente em estudos que investigam o estresse ao calor (41 °C) em oócitos bovinos, em que a maturação apresentou a distribuição completa de grânulos corticais, sugerindo que o estresse pelo calor acelerou a maturação citoplasmática por conta do aumento na translocação dos grânulos corticais para o oolema (Edwards et al., 2005; Moura e Paula-Lopes, 2020).

As taxas de expansão e níveis de fragmentação do DNA das células do cumulus foram similares quando comparados aos grupos controle, apresentando uma ausência de efeito da IL-10 e da refrigeração. As células do cumulus são o local onde as moléculas de crescimento como o TGF-alfa (fator de crescimento transformador alfa), FSH (hormônio folículo-estimulante) e EGF (fator de crescimento epidérmico) (Downs, Daniel e Eppig, 1988; Brucker et al., 1991) atuam regulando a maturação do oócito (Paula-Lopes et al., 1998), e exibem funções de defesa e de suporte à maturação e desenvolvimento do oócito contra pequenas quantidades de espécies reativas de oxigênio durante o estresse à temperaturas ambientais elevadas (Abdelnour et al., 2020). Outros estudos em embriões bovinos (Paula-Lopes et al., 1998) demonstram que a adição de IL-1b durante a maturação *in vitro* também não teve efeito sobre a expansão do cumulus ou sobre o desenvolvimento até o estágio de blastocisto após a fertilização.

É conhecido o papel termoprotetor das células cumulus durante a maturação do oócito (Edwards e Hansen, 1996). Apesar das expectativas de que a IL-10 poderia proteger as células do cumulus contra a fragmentação do DNA induzida pelo frio, a não-expansão das CCs já é observada e conhecida quando os complexos cumulus-oócito são expostos ao choque térmico em temperaturas elevadas (Moura e Paula-Lopes, 2020). Além disso, estudos indicam que a fragmentação do DNA e a proporção de células do cumulus TUNEL positivas estressadas ao calor são significativas (Nabenishi et al., 2012).

Os efeitos negativos da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) decorrentes do estresse à altas temperaturas no crescimento, maturação de oócitos de mamíferos e posterior desenvolvimento embrionário já foram documentadas (Lang et al., 2024; Amaral et al., 2020). Em contrapartida, a temperatura fria de armazenamento pode manter o pH do fluido folicular e evitar a formação de EROs, no entanto, acarreta um efeito prejudicial na viabilidade pré- e pós-FIV do oócito (Wongsrikeao et al., 2005).

Um maior período de armazenamento resulta em uma maior porcentagem de oócitos degenerados, visto que ovários que são armazenados por mais de 6 horas apresentam uma porcentagem de fragmentação do DNA significativamente maior quando comparado com menores tempos de 0h e 3h (Wongsrikeao et al., 2005).

No geral, a via de sinalização da IL-10 envolve outras moléculas e interações proteína-proteína, catálise e ativação/inibição. O homodímero de IL-10, ao se ligar ao seu receptor (IL-10R), que é formado por duas subunidades IL-10R-alfa e IL-10R-beta, ativa as cascatas JAK/STAT (Janus quinase/transdutor de sinal e ativador de transcrição). O domínio extracelular de IL-10R-alfa leva à fosforilação/ativação da JAK1 (Janus Kinase 1) e da TYK2 (tirosina quinase 2), que está associada a IL-10R-beta. Essas JAKs ativadas, fosforilam os resíduos tirosina na cauda do receptor, localizados no domínio intracelular de IL-10R-alfa. Os resíduos fosforilados atuam como sítios de ancoragem temporários para STAT3 (Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição-3). O STAT3 se liga ao receptor e é fosforilado ainda mais pela JAK1, formando assim dímeros de STAT3 que se transloca para o núcleo da célula. No núcleo, ele regula vários genes de progressão do ciclo celular, juntamente com outros genes antiapoptóticos (Verma et al., 2016).

Em nossos estudos anteriores, o tratamento isolado com IL-10 durante a CIV não induz mudanças significativas na capacidade de eclosão de blastocistos, número total de células, ou taxa de apoptose em blastocistos não vitrificados. Nesse caso, o número total de células é maior em blastocistos que eclodiram no D7,5 em comparação àqueles que eclodiram no D8,5 no tratamento controle, porém não são significativamente diferentes quando comparados ao seu tratamento com IL-10 (Silva et al., 2024). Citocinas pró-inflamatórias como a IL-6, LIF e GM-CSF melhoram a taxa de eclosão, no entanto, especulam-se que as citocinas anti-inflamatórias como a IL-10, IL-11 e CSF1 também assumem um papel de liderança na modulação de proteases associadas à eclosão, como estripsina, catepsinas e ISP1 e ISP2 (Seshagiri, Vani e Madhulika, 2016).

6 CONCLUSÃO

A IL-10 na concentração de 100 ng/ml teve um impacto positivo sobre a qualidade dos oócitos durante a MIV em condições de refrigeração, e, em alguns casos, foi efetiva no resgate da maturação nuclear de oócitos quando submetidos à refrigeração antes do processo de maturação. Desta forma, o protocolo mais eficiente para a PIVE neste estudo envolve o transporte dos ovários em menor tempo a 30 °C, aliado à adição de uma alta concentração de IL-10 no meio MIV, uma vez que essa combinação resultou em melhor maturação nuclear dos oócitos, menor fragmentação do DNA e redução no número de células em apoptose. Os achados deste trabalho demonstram o potencial da IL-10 como um aditivo em protocolos de preservação de oócitos, especialmente em condições de exposição ao frio e são pertinentes para investigações futuras sobre o uso de citocinas na melhoria das taxas de maturação oocitária e otimização da qualidade embrionária.

7 REFERÊNCIAS

ABDELNOUR, Sameh A. et al. Molecular, functional, and cellular alterations of oocytes and cumulus cells induced by heat stress and shock in animals. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 38472-38490, 2020.

ALVES, Mayra F. et al. Effect of Heat Stress in the Maturation, Fertilization, and Development Rates of In Vitro-Fertilized Bovine Embryos. **Biology of Reproduction**, v. 87, p. 220, 2012.

AMARAL, Carolina S. 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. **Molecular Reproduction and Development**, v. 87, n. 8, p. 899-909, 2020.

BLONDIN, P. et al. Improving oocyte quality in cows and heifers-What have we learned so far?. **Animal Reproduction (AR)**, v. 9, n. 3, p. 281-289, 2018.

BRUCKER, Cosima et al. Transforming growth factor-alpha augments meiotic maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes. **Molecular reproduction and development**, v. 28, n. 1, p. 94-98, 1991.

CAIRO CONSENSUS GROUP et al. 'There is only one thing that is truly important in an IVF laboratory: everything'Cairo Consensus Guidelines on IVF Culture Conditions. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 40, n. 1, p. 33-60, 2020.

CETIN, Yunus; BASTAN, Ayhan. Cryopreservation of immature bovine oocytes by vitrification in straws. **Animal Reproduction Science**, v. 92, n. 1-2, p. 29-36, 2006.

CHANDRA, Vikash; SHARMA, Gutulla Taru. In vitro strategies to enhance oocyte developmental competence. **Frontiers in Bioscience-Scholar**, v. 12, n. 1, p. 116-136, 2020.

CHATTERJEE, Piyali et al. Regulation of the anti-inflammatory cytokines interleukin-4 and interleukin-10 during pregnancy. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 253, 2014.

COTICCHIO, Giovanni et al. Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. **Human reproduction update**, v. 21, n. 4, p. 427-454, 2015.

CROSIER, Adrienne E. et al. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. **Biology of reproduction**, v. 64, n. 5, p. 1375-1385, 2001.

DINARELLO, Charles A. Proinflammatory cytokines. **Chest**, v. 118, n. 2, p. 503-508, 2000.

DOWNS, Stephen M.; DANIEL, Susan AJ; EPPIG, John J. Induction of maturation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes by follicle-stimulating hormone and epidermal growth factor: Evidence for a positive stimulus of somatic cell origin. **Journal of Experimental Zoology**, v. 245, n. 1, p. 86-96, 1988.

EDWARDS, J. L. et al. Exposure to a physiologically relevant elevated temperature hastens in vitro maturation in bovine oocytes. **Journal of dairy science**, v. 88, n. 12, p. 4326-4333, 2005.

EDWARDS, J. Lannett; HANSEN, Peter J. Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 2, p. 340-346, 1996.

FENG, Xiaoyi et al. Heat-stress impacts on developing bovine oocytes: Unraveling epigenetic changes, oxidative stress, and developmental resilience. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 9, p. 4808, 2024.

GEVA, Eli et al. Interleukin-10 in preovulatory follicular fluid of patients undergoing in-vitro fertilization and embryo transfer. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 37, n. 2, p. 187-190, 1997.

GÓMEZ, Enrique; DIEZ, C. Effects of glucose and protein sources on bovine embryo development in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 58, n. 1-2, p. 23-37, 2000.

HANSEN, Peter J. Effects of heat stress on mammalian reproduction. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1534, p. 3341-3350, 2009.

HOELKER, M. et al. Molecular signatures of bovine embryo developmental competence. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 1, p. 22-36, 2014.

HORTAL, M. et al. IL-6/IL-10 and IL-1 β /IL-4 ratios associated with poor ovarian response in women undergoing in-vitro fertilization. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 280, p. 68-72, 2023.

IDETA, Atsushi et al. A simple medium enables bovine embryos to be held for seven days at 4 C. **Scientific reports**, v. 3, n. 1, p. 1173, 2013.

IWASAKI, S. et al. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized in vitro and in vivo. **Reproduction**, v. 90, n. 1, p. 279-284, 1990.

LABRECQUE, Remi; SIRARD, Marc-Andre. The study of mammalian oocyte competence by transcriptome analysis: progress and challenges. **Molecular human reproduction**, v. 20, n. 2, p. 103-116, 2014.

LANG, L. I. et al. The effects and mechanisms of heat stress on mammalian oocyte and embryo development. **Journal of Thermal Biology**, p. 103927, 2024.

LINARES, T.; PLÖEN, L. On the ultrastructure of seven day old normal (blastocysts) and abnormal bovine embryos. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 10, n. 3, p. 212-226, 1981.

LUSTOSA, Anselmo Alves et al. Aspectos relevantes na produção comercial de embriões bovinos por meio da técnica biotecnológica de fertilização in vitro: Revisão. **Pubvet**, v. 12, p. 130, 2017.

LUU, Vien Viet et al. Nuclear status and DNA fragmentation of oocytes from porcine, bovine and feline ovaries stored at 4° C for 5 days. **CryoLetters**, v. 35, n. 1, p. 48-53, 2014.

MARTINO, Alex; POLLARD, John W.; LEIBO, S. P. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 45, n. 4, p. 503-512, 1996.

MOORE, Kevin W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual review of immunology**, v. 19, n. 1, p. 683-765, 2001.

MOURA, Marcelo T.; PAULA-LOPES, Fabíola F. Thermoprotective molecules to improve oocyte competence under elevated temperature. **Theriogenology**, v. 156, p. 262-271, 2020.

NABENISHI, Hisashi et al. The effects of cysteine addition during in vitro maturation on the developmental competence, ROS, GSH and apoptosis level of bovine oocytes exposed to heat stress. **Zygote**, v. 20, n. 3, p. 249-259, 2012.

NARANJO-GÓMEZ, Juan Sebastian et al. Heat stress on cattle embryo: gene regulation and adaptation. **Heliyon**, v. 7, n. 3, 2021.

OEZOERNEK, M. H. et al. Interferon gamma and interleukin 10 levels in preimplantation embryo culture media. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 12, p. 590-593, 1995.

OUYANG, Wenjun; O'GARRA, Anne. IL-10 family cytokines IL-10 and IL-22: from basic science to clinical translation. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 871-891, 2019.

PANG, Yunwei et al. Protective effects of melatonin on the in vitro developmental competence of bovine oocytes. **Animal Science Journal**, v. 89, n. 4, p. 648-660, 2018.

PAULA-LOPES, F. F. et al. Regulation of preimplantation development of bovine embryos by interleukin-1 β . **Biology of reproduction**, v. 59, n. 6, p. 1406-1412, 1998.

PAYTON, Rebecca R. et al. Susceptibility of bovine germinal vesicle-stage oocytes from antral follicles to direct effects of heat stress in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 4, p. 1303-1308, 2004.

RIZOS, Dimitrios et al. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular reproduction and development**, v. 61, n. 2, p. 234-248, 2002.

SANG, Lei et al. Actions of putative embryokines on development of the preimplantation bovine embryo to the blastocyst stage. **Journal of dairy science**, v. 103, n. 12, p. 11930-11944, 2020.

SCIORIO, Romualdo et al. Morphometric Blastocyst Assessment: A Retrospective Study Examining the Relationship Between Blastocyst Diameter and Area and Pregnancy Outcomes in Assisted Reproduction Technology Cycles. **Journal of clinical medicine**, v. 14, n. 8, p. 2827, 2025.

SEEKFORD, Zachary K. et al. Interleukin-6 supplementation improves post-transfer embryonic and fetal development of in vitro-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 170, p. 15-22, 2021.

SESHAGIRI, Polani B.; VANI, Venkatappa; MADHULIKA, Pathak. Cytokines and blastocyst hatching. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 75, n. 3, p. 208-217, 2016.

SILVA, Mara Viana et al. Effect of IL-10 and TNF- α on the competence and cryosurvival of in vitro produced *Bos indicus* embryos. **Theriogenology**, v. 215, p. 170-176, 2024.

SIRARD, M. A.; BLONDIN, P. Oocyte maturation and IVF in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1-4, p. 417-426, 1996.

SIRARD, Marc-André et al. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 126-136, 2006.

SPRÍCIGO, J. F. W. et al. Effect of the exposure to methyl- β -cyclodextrin prior to chilling or vitrification on the viability of bovine immature oocytes. **Cryobiology**, v. 65, n. 3, p. 319-325, 2012.

THOMPSON, J. G. E. et al. Effect of oxygen concentration on in-vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos. **Reproduction**, v. 89, n. 2, p. 573-578, 1990.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A. M. et al. Effects of different reproduction techniques: AI, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. **Theriogenology**, v. 53, n. 2, p. 575-597, 2000.

VERMA, Renu et al. A network map of Interleukin-10 signaling pathway. **Journal of cell communication and signaling**, v. 10, p. 61-67, 2016.

VIANA, Joao. 2023 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. **Embryo Technology Newsletter**, v. 42, n. 4, 2024.

WONGSRIKEAO, Pimrapar et al. Effects of ovary storage time and temperature on DNA fragmentation and development of porcine oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, v. 51, n. 1, p. 87-97, 2005.

WOOLDRIDGE, Lydia K.; EALY, Alan D. Interleukin-6 increases inner cell mass numbers in bovine embryos. **BMC developmental biology**, v. 19, p. 1-11, 2019.

WU, Bin; TONG, Jiangen; LEIBO, S. P. Effects of cooling germinal vesicle–stage bovine oocytes on meiotic spindle formation following in vitro maturation. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 54, n. 4, p. 388-395, 1999.

WU, MING-YIH et al. Increase in the production of interleukin-10 early after implantation is related to the success of pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 46, n. 6, p. 386-392, 2001.

XIE, Qi et al. Chitosan oligosaccharide improves ovarian granulosa cells inflammation and oxidative stress in patients with polycystic ovary syndrome. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1086232, 2023.

ZHAO, Mingdong et al. IL-10 reduces levels of apoptosis in *Toxoplasma gondii*-infected trophoblasts. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e56455, 2013.