

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITOS DE ANTIOXIDANTES E DA ATMOSFERA  
GASOSA EM DIFERENTES ETAPAS DA PRODUÇÃO *IN*  
*VITRO* SOBRE O DESENVOLVIMENTO E  
CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS**

**Nathália Alves de Souza Rocha  
Médica Veterinária**

**Jaboticabal – São Paulo – Brasil  
2012**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITOS DE ANTIOXIDANTES E DA ATMOSFERA  
GASOSA EM DIFERENTES ETAPAS DA PRODUÇÃO *IN*  
*VITRO* SOBRE O DESENVOLVIMENTO E  
CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS**

**Nathália Alves de Souza Rocha**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gisele Zoccal Mingoti**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Fevereiro de 2012**

R672e Rocha, Nathália Alves de Souza  
Efeitos de antioxidantes e da atmosfera gasosa em diferentes etapas da produção *in vitro* sobre o desenvolvimento e criotolerância de embriões bovinos . -- Jaboticabal, 2012  
xv, 85 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012  
Orientadora: Gisele Zoccal Mingoti  
Banca examinadora:.,Joaquim Mansano Garcia, Juliana Corrêa Borges da Silva  
Bibliografia

1. Antioxidante. 2. Criotolerância. 3. Bovino I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.6:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

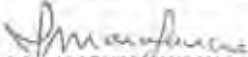
**TÍTULO:** EFEITOS DE ANTIOXIDANTES E DA ATMOSFERA GASOSA EM DIFERENTES ETAPAS DA PRODUÇÃO *IN VITRO* SOBRE O DESENVOLVIMENTO E CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS

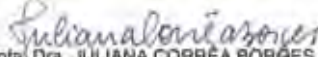
**AUTORA:** NATHALIA ALVES DE SOUZA ROCHA

**ORIENTADORA:** Profa. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: REPRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora;

  
Profa. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI  
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Odontologia de Araçatuba

  
Prof. Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

  
Profa. Dra. JULIANA CORRÊA BORGES SILVA  
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - USP / Piracicaba/SP

Data da realização: 27 de fevereiro de 2012.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**NATHÁLIA ALVES DE SOUZA ROCHA** – nascida em Ribeirão Preto – SP, aos 7 dias do mês de novembro de 1985. Concluiu o ensino médio no Colégio Oswaldo Cruz (COC), na cidade de Ribeirão Preto – SP, em dezembro de 2003. Ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP Campus Jaboticabal-SP, em março de 2005. Concluiu o ensino superior em Medicina Veterinária em dezembro de 2009. Durante a graduação realizou estágio de Iniciação Científica sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Ass. Dr<sup>a</sup>. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, junto à disciplina de Patologia Animal, com bolsa de iniciação científica da FAPESP, referentes aos processos n<sup>o</sup> 2007/01457-3. Ingressou no curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, nível de Mestrado e área de concentração de Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP Campus de Jaboticabal-SP, em março de 2010, sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Ass. Dr<sup>a</sup>. Gisele Zoccal Mingoti, com bolsa de mestrado do CNPq. Aprovada no Exame de Seleção para o curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária e área de concentração de Reprodução Animal, nível de Doutorado nesta mesma instituição, em outubro de 2011, com início previsto para março de 2012.

## **EPÍGRAFE**

**“Embora ninguém possa voltar atrás e  
fazer um novo começo, qualquer um pode  
começar agora e fazer um novo fim”**

**Chico Xavier**

## DEDICO

Aos meus pais,

Márcio de Souza Rocha e Beatriz Alves de Souza Rocha

À minha querida irmã Fernanda e minha avó Vera Alice

Pelo apoio e amor incondicional.

Ao meu amor Fabio,

Pela compreensão e companheirismo em todos os momentos

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre mostrar que caminho seguir...

Em especial à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gisele Zoccal Mingoti, pela confiança em mim depositada, amizade, dedicação e pela sabedoria em ser uma orientadora e pesquisadora exemplar.

À minha querida amiga e companheira de laboratório Beatriz Caetano da Silva Leão, pelos ensinamentos, amizade e cumplicidade durante esses anos.

Ao Dr. Érikliis Nogueira, pelos conselhos e disponibilidade em auxiliar com as análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia, pela indicação da professora Gisele e pelos conhecimentos e sugestões transmitidos na defesa.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Juliana Corrêa Borges da Silva, pelo auxílio e pelos conselhos durante o experimento e pela participação e contribuição na defesa.

Ao Prof. Dr. Iveraldo Santos Dutra, pela disponibilidade em ajudar e apoio dispensados durante esses anos.

À companheira de laboratório Mônica Ferreira Accorsi, pelos ensinamentos e companheirismo.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista, e ao departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal – DRA pela oportunidade oferecida.

À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual paulista, e ao departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal pelas instalações e condições de trabalho.

Ao Dr. Luís Alfredo Garcia Deragon, gerente administrativo da central Alta Genetics Brasil Ltda, pela doação das palhetas de sêmen utilizadas durante os experimentos que foram desenvolvidos.

Ao Dr. Carlos Gilberto Almodin, médico responsável da empresa Materbaby – Human Reproduction, pela doação dos kits de vitrificação (Ingámed®) utilizados durante os experimentos que foram desenvolvidos.

À técnica de laboratório Alessandra Ragozo, pelo auxílio durante os experimentos. Ao funcionário Adão pela disponibilidade em buscar o material de trabalho necessário aos experimentos.

Aos amigos de Jaboticabal, Tekila, Tucura, Fricote e à República As Bardosa pela amizade, pela lealdade e pelo companheirismo durante esses anos de mestrado.

Aos amigos Rafael, Larissa, Tamíris e Leandro pela amizade, companhia e apoio constante nas dificuldades e conquistas.

A todos, que de alguma forma, contribuíram com incentivo, apoio e confiança para que esse trabalho se tornasse realidade e concluísse a realização de um sonho.

## **APOIO FINANCEIRO**

Este projeto teve bolsa concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, sob o processo nº 130611/2010-7 e foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, sob o processo nº 2011/18257-2.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO.....	xii
SUMMARY.....	xiv
<b>CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>1</b>
Introdução.....	1
Revisão de Literatura.....	4
Espécies reativas de oxigênio, sua relação com o estresse oxidativo e seus efeitos na produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos.....	4
Biossíntese da glutathiona (GSH) e sua importância no oócito e no embrião.....	6
Efeito da adição de antioxidantes nos meios de cultivo <i>in vitro</i> .....	8
Controle de atmosfera gasosa durante a produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos.....	11
Apoptose em células embrionárias.....	12
Criopreservação e criotolerância de embriões PIV.....	13
Referências.....	16
<b>CAPÍTULO 2 - EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ANTIOXIDANTES E DA ATMOSFERA GASOSA EM DIFERENTES PERÍODOS DO CULTIVO <i>IN VITRO</i> SOBRE O DESENVOLVIMENTO E CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES PIV.....</b>	<b>24</b>
Resumo.....	24
Introdução.....	26

<b>Material e Métodos.....</b>	<b>28</b>
<b>Reagentes químicos.....</b>	<b>28</b>
<b>Obtenção e seleção de oócitos provenientes de ovários de     abatedouro.....</b>	<b>28</b>
<b>Maturação <i>in vitro</i> dos oócitos.....</b>	<b>29</b>
<b>Fertilização <i>in vitro</i>.....</b>	<b>29</b>
<b>Cultivo embrionário <i>in vitro</i>.....</b>	<b>30</b>
<b>Vitrificação e Reaquecimento dos embriões.....</b>	<b>30</b>
<b>Mensuração do conteúdo intracelular de espécies reativas de     oxigênio (ROS) pelo ensaio com diclorofluoresceína.....</b>	<b>31</b>
<b>Delineamento experimental.....</b>	<b>32</b>
<b>Experimento I: Efeitos da suplementação com antioxidantes e da         atmosfera gasosa durante todo o período de cultivo <i>in vitro</i> sobre o         desenvolvimento e criotolerância de embriões PIV.....</b>	<b>32</b>
<b>Experimento II: Efeitos da suplementação com antioxidantes e da         atmosfera gasosa durante 72 horas do cultivo <i>in vitro</i> sobre o         desenvolvimento e criotolerância de embriões PIV.....</b>	<b>33</b>
<b>Análise estatística.....</b>	<b>34</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>35</b>
<b>Experimento I: Efeitos da suplementação com antioxidantes e da     atmosfera gasosa durante todo o cultivo <i>in vitro</i> sobre o     desenvolvimento e criotolerância de embriões PIV.....</b>	<b>35</b>
<b>Experimento II: Efeitos da suplementação com antioxidantes e da     atmosfera gasosa durante 72 horas do cultivo <i>in vitro</i> sobre o     desenvolvimento e criotolerância de embriões PIV.....</b>	<b>39</b>
<b>Discussão.....</b>	<b>43</b>
<b>Conclusão.....</b>	<b>51</b>
<b>Referências.....</b>	<b>52</b>

<b>CAPÍTULO 3 - EFEITOS DE ANTIOXIDANTES NAS DIFERENTES ETAPAS DA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> SOBRE O DESENVOLVIMENTO E CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS.....</b>	<b>57</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>57</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>59</b>
<b>Material e métodos.....</b>	<b>61</b>
<b>Reagentes químicos.....</b>	<b>61</b>
<b>Obtenção e seleção de oócitos provenientes de ovários de abatedouro.....</b>	<b>61</b>
<b>Maturação <i>in vitro</i> dos oócitos.....</b>	<b>62</b>
<b>Fertilização <i>in vitro</i>.....</b>	<b>62</b>
<b>Cultivo embrionário <i>in vitro</i>.....</b>	<b>63</b>
<b>Vitrificação e Reaquecimento dos embriões.....</b>	<b>64</b>
<b>Mensuração do conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelo ensaio com diclorofluoresceína.....</b>	<b>64</b>
<b>Coloração “Terminal Transferase Assay” – TUNEL.....</b>	<b>65</b>
<b>Delineamento experimental.....</b>	<b>66</b>
<b>Análise estatística.....</b>	<b>67</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>68</b>
<b>Discussão.....</b>	<b>73</b>
<b>Conclusão.....</b>	<b>80</b>
<b>Referências.....</b>	<b>81</b>

## LISTA DE TABELAS

Página

**CAPÍTULO 2 - EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ANTIOXIDANTES E DA ATMOSFERA GASOSA EM DIFERENTES PERÍODOS DO CULTIVO *IN VITRO* SOBRE O DESENVOLVIMENTO E CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS**

<b>Tabela 1-</b> Clivagem e desenvolvimento de embriões cultivados <i>in vitro</i> e meio suplementado com diferentes antioxidantes (cisteína, cisteína + cisteamina ou catalase), até o D7 (168 hpi).....	36
<b>Tabela 2-</b> Clivagem e desenvolvimento de embriões cultivados <i>in vitro</i> sob diferentes tensões de oxigênio.....	37
<b>Tabela 3-</b> Clivagem e desenvolvimento de embriões cultivados <i>in vitro</i> em meio suplementado com diferentes antioxidantes (cisteína, cisteína + cisteamina ou catalase), até o D7 (168 hpi).....	38
<b>Tabela 4-</b> Taxa de re-expansão após desvitrificação e recultivo <i>in vitro</i> por 24 horas de embriões CIV em meio suplementado com diferentes antioxidantes (cisteína, cisteína + cisteamina ou catalase), até o D7 (168 hpi), em diferentes tensões de oxigênio (20 ou 7% de O <sub>2</sub> ).....	39
<b>Tabela 5-</b> Desenvolvimento de embriões cultivados <i>in vitro</i> em meio suplementado com diferentes antioxidantes (cisteína, β-mercaptoetanol ou catalase), até o D3 (72 hpi), em diferentes tensões de oxigênio (20 ou 7% de O <sub>2</sub> ).....	40
<b>Tabela 6-</b> Clivagem e desenvolvimento de embriões cultivados <i>in vitro</i> sob diferentes tensões de oxigênio.....	41
<b>Tabela 7-</b> Clivagem e desenvolvimento de embriões cultivados <i>in vitro</i> em meio suplementado com diferentes antioxidantes (cisteína, β-mercaptoetanol ou catalase), até o D3 (72 hpi).....	41

<b>Tabela 8-</b> Níveis intracelulares de ROS em embriões bovinos cultivados <i>in vitro</i> sob diferentes tensões de oxigênio.....	42
<b>Tabela 9-</b> Níveis intracelulares de ROS em embriões bovinos cultivados <i>in vitro</i> com diferentes antioxidantes.....	42
<b>Tabela 10-</b> Taxa de re-expansão após desvitrificação e recultivo <i>in vitro</i> por 24 horas de embriões CIV em meio suplementado com diferentes antioxidantes (cisteína, $\beta$ -mercaptoetanol, catalase) até o D3 (72 hpi), em diferentes tensões de oxigênio (20 ou 7% de O <sub>2</sub> ).....	43

### **CAPÍTULO 3 - EFEITOS DE ANTIOXIDANTES NAS DIFERENTES ETAPAS DA PRODUÇÃO *IN VITRO* SOBRE O DESENVOLVIMENTO E CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS**

<b>Tabela 1-</b> Médias (quadrados mínimos $\pm$ EPM) das taxas (%) de clivagem e desenvolvimento de embriões bovinos produzidos a partir de oócitos cultivados com diferentes antioxidantes durante a maturação e/ou cultivo <i>in vitro</i> .....	68
<b>Tabela 2-</b> Efeitos da suplementação com diferentes antioxidantes durante a produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos sobre as taxas (%) de clivagem e desenvolvimento até a fase de blastocistos (médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM).....	69
<b>Tabela 3-</b> Efeitos do momento (MIV e/ou CIV) da suplementação com diferentes antioxidantes durante a produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos sobre as taxas (%) de clivagem e desenvolvimento até a fase de blastocistos (médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM).....	69
<b>Tabela 4-</b> Níveis intracelulares de ROS em blastocistos bovinos produzidos <i>in vitro</i> a partir de oócitos cultivados com diferentes antioxidantes durante a maturação e/ou cultivo <i>in vitro</i> .....	70
<b>Tabela 5-</b> Efeitos da suplementação com diferentes antioxidantes durante a produção <i>in vitro</i> sobre o número total de células e taxa (%) de apoptose em blastocistos bovinos.....	71

<b>Tabela 6-</b> Efeitos do momento (MIV e/ou CIV) da suplementação com diferentes antioxidantes durante a produção <i>in vitro</i> sobre o número total de células e taxa (%) de apoptose em blastocistos bovinos.....	72
<b>Tabela 7-</b> Sobrevivência pós-desvitrificação de embriões produzidos a partir de oócitos cultivados com antioxidantes durante a maturação ou cultivo <i>in vitro</i> .....	73

## LISTA DE FIGURAS

Página

**CAPÍTULO 2 - EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ANTIOXIDANTES E DA  
ATMOSFERA GASOSA EM DIFERENTES PERÍODOS DO CULTIVO *IN VITRO*  
SOBRE O DESENVOLVIMENTO E CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES  
BOVINOS****Figura 1.** Atividades desenvolvidas no Experimento I.....33**Figura 2.** Atividades desenvolvidas no Experimento II.....34**CAPÍTULO 3 - EFEITOS DE ANTIOXIDANTES NAS DIFERENTES ETAPAS DA  
PRODUÇÃO *IN VITRO* SOBRE O DESENVOLVIMENTO E CRIOTOLERÂNCIA  
DE EMBRIÕES BOVINOS****Figura 1.** Atividades desenvolvidas no Experimento.....67

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**ANOVA** - Análise de variância

**ATX** – Antioxidante

**β-ME** - β-mercaptoetanol

**BME** - Solução de aminoácidos 50X

**BSA** - Albumina sérica bovina

**°C** - Graus Celsius

**C+C** - Cisteína associado à cisteamina

**CAT** - Catalase

**CIST** - Cisteína

**CIV** - Cultivo *in vitro*

**CO<sub>2</sub>** - Dióxido de carbono

**COCs** - Complexo *cumulus* oócito

**DNA** - Ácido desoxirribonucléico

**EPM** - Erro padrão da média

**FIV** - Fertilização *in vitro*

**FSH** - Hormônio folículo estimulante

**g** - Força gravitacional

**G** - Gauge (unidade de medida de calibre)

**GPX** - Glutathiona peroxidase

**GSH** - Glutathiona

**GSH/GSSG** - Glutathiona reduzida/glutathiona oxidada

**h** - hora

**H<sub>2</sub>DCFDA** - 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydro-fluorescein diacetate

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - Peróxido de hidrogênio

**hCG** - Gonadotrofina coriônica humana

**HEPES** - N- (2-hydroxyethyl) piperazine-N'- (2-ethanesulfonic acid); 4- (2-Hydroxyethyl) piperazine- 1-ethanesulfonic acid

**HO<sub>2</sub>** - Radical hidroperóxido

**hpi** - horas pós-inseminação

**IETS** - International Embryo Transfer Society

**LH** - Hormônio luteinizante

**MEM** - Solução de aminoácidos não essenciais 100X

**mg** - Miligrama

**MII** - Metáfase II

**MIV** - Maturação *in vitro*

**mL** - Mililitro

**mm** - Milímetros

**mM** - Milimolar

**Mn-SOD** - Enzima manganês –superóxido dismutase

**n** - Número

**N<sub>2</sub>** - Nitrogênio

**NADPH** - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase

**nm** - Nanômetro

**NO** - Óxido nítrico

**O<sub>2</sub>** - Oxigênio

**O<sub>2</sub><sup>·-</sup>** - Radical ânion superóxido

**OH<sup>·</sup>** - Radical hidroxila

**PBS** - Solução salina em tampão fosfato

**PHE** - Penicilina, Hipotaurina e Epinefrina

**PIV** - Produção de embriões *in vitro*

**PVP** - Polivinil-pirrolidona

**redox** - Estado de redução-oxidação

**ROS** - (Reactive oxygen species): Espécies reativas de oxigênio

**SAS** - Sistema de análise estatística

**SFB** - Soro fetal bovino

**SOD** - Superóxido dismutase

**SOFa** - Meio de cultivo "Synthetic Oviduct Fluid" suplementado com aminoácidos

**TALP-FIV** - Tyrode's albumina lactato piruvato

**TCM** - (tissue culture medium): Meio de cultura para tecidos

**TdT** - Terminal deoxynucleotidyl transferase

**TUNEL** - *In situ terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick and labeling assay*

**UI** - Unidades internacionais

**µg** - Micrograma

**µL** - Microlitro

**µM** - Micromolar

**%** - Porcentagem

## EFEITOS DE ANTIOXIDANTES E DA ATMOSFERA GASOSA EM DIFERENTES ETAPAS DA PRODUÇÃO *IN VITRO* SOBRE O DESENVOLVIMENTO E CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS

**RESUMO** – O estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar os efeitos da suplementação com antioxidantes intracelulares e extracelulares em diferentes etapas da PIV (MIV e/ou CIV), e da tensão de oxigênio durante o CIV sobre o desenvolvimento e criotolerância de embriões bovinos. No Exp.1 foi realizada a suplementação com antioxidantes {0,6 mM cisteína (CIST), 0,6 mM cisteína associado á 100 µM de cisteamina (C+C) e 100 UI catalase (CAT)} durante todo o período de CIV, em diferentes atmosferas gasosas {5% CO<sub>2</sub> em ar (20% O<sub>2</sub>) ou atmosfera controlada (7% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> e 88% N<sub>2</sub>)}. Já, no Exp. 2 foi realizada a suplementação com antioxidantes {0,6 mM cisteína (CIST), 100 UI catalase (CAT) e 100 µM de β-mercaptoetanol (β-ME)} durante 72 horas de CIV, nas diferentes atmosferas gasosas. Posteriormente, após definir a tensão de oxigênio, bem como, o período de suplementação adequado para o CIV, foi realizada a adição de antioxidantes durante a maturação *in vitro* (MIV) e/ou 72 horas de CIV (Exp.3). No Exp.1, a taxa de desenvolvimento embrionário foi adversamente afetada (P<0,05) pelos tratamentos CIST (11,2%) e C+C (1,4%), em relação ao Controle (26,6%), e pela tensão de oxigênio (17,2% e 11,1%; 20 e 7% O<sub>2</sub>, respectivamente). Em relação à taxa de re-expansão, após reaquecimento e cultivo *in vitro* por 24 horas, não houve diferença significativa (P>0,05) entre os tratamentos avaliados (66,7% a 100%). No Exp.2, as taxas de blastocistos não foram afetadas (P>0,05) pelos tratamentos CIST, β-ME e CAT (43,7% a 48,5%), porém a baixa tensão de oxigênio afetou adversamente (P<0,05) o desenvolvimento embrionário (52,1% e 38,4%; 20 e 7% O<sub>2</sub> respectivamente). A mensuração dos níveis intracelulares de ROS não foi afetada (P>0,05) pelas variáveis tratamentos (0,95 a 0,78) e tensão de oxigênio (0,88 e 0,86; 20 e 7% O<sub>2</sub> respectivamente). Nenhuma diferença foi observada nas taxas de re-expansão

( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos avaliados (63,6% a 93,3%). No Exp.3, em relação aos diferentes antioxidantes e ao momento da suplementação, não houve diferença ( $P > 0,05$ ) nas taxas de clivagem (80,0% a 82,9% e 80,0% a 82,5%; respectivamente) e de blastocistos (40,5% a 56,4% e 41,7% a 55,4%; respectivamente), bem como no número de células totais (85,7 a 90,5 e 84,4 a 90,5; respectivamente) entre os grupos avaliados. Já a porcentagem de células apoptóticas foi reduzida em ambas as variáveis em relação ao Controle ( $P < 0,05$ ). Os resultados deste estudo demonstraram que embriões de todos os grupos apresentaram redução nos níveis intracelulares de ROS ( $P < 0,05$ ), com exceção daqueles suplementados com  $\beta$ -ME durante o CIV (0,88), que não diferiu ( $P > 0,05$ ) do Controle (1,00). Após reaquecimento e recultivo *in vitro* por 24 horas, as taxas de re-expansão embrionária não foram afetadas ( $P > 0,05$ ) pelos tratamentos. Com base nas presentes condições experimentais, a suplementação com antioxidantes intracelulares durante todo o período de CIV e a baixa tensão de oxigênio foram deletérias ao desenvolvimento embrionário. Por outro lado, a suplementação com antioxidantes intra ou extracelulares durante a maturação e/ou durante as primeiras 72 horas de cultivo *in vitro* diminuiu a geração de espécies reativas de oxigênio e apoptose em blastocistos bovinos, todavia este benefício não resultou em aumento nas taxas de desenvolvimento e de criotolerância embrionária.

**Palavras-Chave:** antioxidantes, bovino, criopreservação, embriões, produção *in vitro*, tensão de oxigênio

**EFFECTS OF ANTIOXIDANTS AND GAS ATMOSPHERE AT  
DIFFERENTS STAGES OF *IN VITRO* PRODUCTION ON THE DEVELOPMENT  
AND CRYORESISTANCE OF BOVINE EMBRYOS**

**SUMMARY** – This study was conducted to evaluate the effects of intracellular and extracellular antioxidants supplementation, in different stages of IVP (IVM and/or IVC), and oxygen tension during IVC on development, quality and cryotolerance of bovine embryos. Exp.1 was performed with the supplementation with antioxidants {0.6 mM cysteine (CIST); 0.6 mM cysteine associated to 100  $\mu$ M cysteamine (C+C); 100 UI catalase (CAT)} during entire period of IVC in different gaseous atmospheres {5% CO<sub>2</sub> in air (20% O<sub>2</sub>) or controlled atmosphere (7% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and 88% N<sub>2</sub>)}. Already, in Exp.2 was performed the antioxidant supplementation {0.6 mM cysteine (CIST); 100  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol ( $\beta$ -ME); 100 UI catalase (CAT)} for 72 hours of IVC in different gaseous atmospheres. Later, after setting the oxygen tension as well as the supplementation period suitable for IVC, was carried out the addition of antioxidants during *in vitro* maturation (IVM) and/or 72 hours of IVC (Exp.3). In Exp.1, the rate of embryo development was adversely affected ( $P < 0.05$ ) by the treatments CIST (11.2%) and C+C (1.4%), compared to Control (26.6%), and oxygen tension (17.2% and 11.1%, 20 and 7%O<sub>2</sub>, respectively). Regarding the re-expansion rate after warming and *in vitro* culture for 24 hours, no difference ( $P > 0.05$ ) between the treatments were found (66.7% to 100%). In Exp.2, blastocysts rates were not affected ( $P > 0.05$ ) by treatments CIST,  $\beta$ -ME and CAT (43.7% to 48.5%), but the low oxygen tension adversely affected ( $P < 0.05$ ) embryo development (52.1% to 38.4%, 20 and 7%O<sub>2</sub>, respectively). The quantification of intracellular levels of ROS was not affected ( $P > 0.05$ ) by the variables treatments (0.95 to 0.78) and oxygen tension (0.88 to 0.86, 20 and 7%O<sub>2</sub>, respectively). No differences were observed in re-expansions rates ( $P > 0.05$ ) between the treatments (63.6% to 93.3%). In Exp.3, in respect of different antioxidant and the period of supplementation, no significant difference were found

( $P>0.05$ ) in cleavage rates (80.0% to 82.9%, 80.0% to 82.5%, respectively) and blastocysts frequencies (40.5% to 56.4%, 41.7% to 55.4%, respectively), as well as the total number of blastomeres (85.7 to 90.5, 84.4 to 90.5, respectively) between the groups. However, the percentage of apoptotic cells was reduced in both variables, compared to Control ( $P<0.05$ ). The results of this study demonstrated that embryos of all groups showed a reduction in intracellular levels of ROS ( $P<0.05$ ), except those supplemented with  $\beta$ -ME during IVC (0.88), which did not differ ( $P>0.05$ ) from Control (1.00). After warming an *in vitro* culture for 24 h, embryo re-expansion rates were not affected by the treatments. Based on the present experimental conditions, the intracellular antioxidant supplementation during entire period of IVC and low oxygen tension were deleterious to embryonic development. Moreover, the supplementation with intra or extracellular antioxidants during maturation and/or during the first 72 hours of IVC decreased generation of reactive oxygen species and apoptosis in bovine blastocysts, however this improvement did not result in increase on rates of embryonic development and criotolerance.

**Keywords:** antioxidants, bovine, cryopreservation, embryo, *in vitro* production, oxygen tension

## CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

### Introdução

Na maioria das espécies de mamíferos, os embriões em primeiros estágios de desenvolvimento encontram-se no lúmen do oviduto, onde há menor tensão parcial de oxigênio (3 a 15% O<sub>2</sub>; THOMPSON *et al.*, 1990; VOELKEL *et al.*, 1992) quando comparado com o ar atmosférico (aproximadamente 20%; BETTERIDGE, 1995). Apesar disso, as condições de oxigênio atmosférico têm sido utilizadas rotineiramente para cultura de embriões de mamíferos. Tensões suprafisiológicas de oxigênio podem gerar a formação de espécies reativas de oxigênio (do inglês, ROS) durante a cultura de embriões (BAVISTER, 1995), gerando estresse oxidativo.

O estresse oxidativo pode ser definido como o resultado do desequilíbrio entre a produção de ROS e os mecanismos celulares antioxidantes (FEUGANG *et al.*, 2003). A auto-oxidação por ROS e radicais lipídicos são as principais causas de danos e retardo no desenvolvimento celular durante o cultivo (JOENJE, 1989). O estresse oxidativo promove peroxidação lipídica, oxidação de aminoácidos e ácidos nucléicos, o que conseqüentemente culmina com a apoptose celular (RIZOS *et al.*, 2001). A concentração intracelular de ROS aumenta em sistemas de produção *in vitro* (GOTO *et al.*, 1993), podendo estar relacionada com o bloqueio do desenvolvimento embrionário (NODA, 1992) e com a diminuição da eficiência de produção e qualidade dos embriões produzidos (FEUNGANG *et al.*, 2003). Apesar desses efeitos negativos, a geração de ROS pode ser considerada fisiológica em algumas circunstâncias e é um elemento importante da apoptose ou morte celular programada, sendo um mecanismo de extrema importância para eliminação de células inviáveis. No entanto, durante a cultura prolongada, várias anomalias no desenvolvimento embrionário foram detectadas (LEESE *et al.*, 1998)

e estas podem ser atribuídas à altas concentrações de oxigênio as quais embriões são expostos.

Embriões produzidos *in vitro* (PIV) são mais sensíveis às baixas temperaturas e possuem criotolerância inferior quando comparados a embriões produzidos *in vivo* (IMAI *et al.*, 2002). Isso ocorre devido ao aumento na concentração lipídica de embriões durante o cultivo *in vitro* (CIV) em decorrência da inclusão de certos componentes presentes no meio de cultivo, como por exemplo, o soro fetal. O acúmulo de lipídeos e consequente aumento da oxidação lipídica por ROS no embrião PIV é prejudicial ao seu desenvolvimento e criotolerância, pois segundo TARIN & TROUNSON (1993), a inibição da oxidação lipídica aumenta a viabilidade de embriões de ratos após os processos de congelação e reaquecimento.

Para evitar danos induzidos pelo estresse oxidativo ao embrião, vários antioxidantes podem ser adicionados ao meio de cultura para melhorar o desenvolvimento com sucesso variável (GOTO *et al.*, 1993; NODA *et al.*, 1991). Diversos antioxidantes como o  $\beta$ -mercaptoetanol, cisteína, cistina, cisteamina, catalase e vitamina E tem sido utilizados como suplementos do meio de maturação de oócitos (DE MATOS *et al.*, 1995; 1997) e de cultivo embrionário (CAAMAÑO *et al.*, 1996; LIM *et al.*, 1999; TAKAHASHI *et al.*, 1993; ORSI & LEESE, 2001; OLSON & SEIDEL, 2000). Estes compostos servem como precursores da síntese de glutathiona (GSH) no embrião. A GSH é necessária para a detoxificação de peróxidos lipídicos e de proteínas tioladas, além disso também está envolvida na remoção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em embriões (JOHNSON & NARS-ESFAHANI, 1994). Desta forma, o baixo desenvolvimento embrionário em ambiente com elevada tensão de oxigênio pode ser restaurado com a adição de antioxidantes ao meio CIV (GOTO *et al.*, 1993; NODA *et al.*, 1991).

A biossíntese de GSH depende da presença de L-cisteína no meio, sendo que a ação do  $\beta$ -mercaptoetanol consiste na incorporação da cisteína e cistina presentes no meio de cultivo para dentro das células (CAAMAÑO *et al.*, 1996; LIM

*et al.*, 1999; TAKAHASHI *et al.*, 1993; BANNAI *et al.*, 1984; FURNUS & DE MATOS, 1999). Estudos relatam que fora da célula, a cisteína é instável e provavelmente nem esteja presente no meio de cultivo devido à sua auto-oxidação para cistina (BANNAI *et al.*, 1984; SAGARA *et al.*, 1993). Por outro lado, mais recentemente foi demonstrado que, após a suplementação inicial do meio de maturação com 0,6 mM cisteína, esta ainda estava presente no meio após 3 e 24 horas de incubação (respectivamente em 40 e 3% da concentração inicial), e isso foi suficiente para estimular a síntese de GSH em oócitos bovinos (DE MATOS *et al.*, 1996).

A necessidade da suplementação com antioxidantes durante o CIV, em condição de baixa tensão de oxigênio, ainda não está bem elucidada. Algumas questões ainda necessitam ser compreendidas, tais como se a proteção deve ser extracelular ou intracelular e qual o período de suplementação necessário (ALI *et al.*, 2003). Sobretudo, pouca atenção tem sido dada ao efeito da adição de antioxidantes nos meios de maturação *in vitro* (MIV) e CIV sobre a criotolerância dos embriões bovinos (HOSSEINI *et al.*, 2009).

Pelo exposto, a proteção dos embriões PIV contra o estresse oxidativo parece ser uma das chaves para o aprimoramento do desenvolvimento embrionário *in vitro* (TAKAHASHI *et al.*, 2002). Desta forma, o estudo foi conduzido com objetivo principal de avaliar os efeitos de antioxidantes, intracelulares e extracelulares, e da atmosfera gasosa, nas diferentes etapas da produção *in vitro*, sobre o desenvolvimento e sucesso da criopreservação de embriões bovinos.

## Revisão de Literatura

### **Espécies reativas de oxigênio, sua relação com o estresse oxidativo e seus efeitos na produção *in vitro* de embriões bovinos**

O estresse oxidativo pode ser definido como o resultado do desequilíbrio dos mecanismos endógenos protetores quando relacionado com a produção de ROS. Sob condições fisiológicas, a fosforilação oxidativa nas mitocôndrias é a principal fonte de ROS (FEUGANG *et al.*, 2003).

As ROS são produzidas por oócitos, embriões e pelas células do *cumulus oophorus* (GUÉRIN *et al.*, 2001) durante o metabolismo aeróbico e são extremamente reativas e instáveis, podendo interagir com diversas moléculas, como por exemplo, ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos e lipídeos, para adquirirem elétrons e conseqüentemente se tornarem estáveis (DELEUZE & GOUDET, 2010; WARNER, 1994). Essas interações, por sua vez, induzem uma cascata de reações em cadeia que eventualmente podem levar a danos celulares (ATTARAN *et al.*, 2000; PIERCE *et al.*, 2004; SZCZEPANSKA & KOZLIK, 2003).

As ROS são formadas durante as etapas intermediárias da redução da molécula de oxigênio, incluindo o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) que correspondem à redução de um, dois e três elétrons, respectivamente. A ativação da molécula de oxigênio é catalisada por pequenas moléculas (xenobióticos) ou por complexos metálicos. Ainda, o radical hidroperóxido ( $HO_2$ ), um ácido conjugado do radical superóxido, desempenha um papel fundamental na ativação da cascata da peroxidação lipídica nas membranas celulares (GUÉRIN *et al.*, 2001).

As ROS estão envolvidas em diversos processos relacionados com a fisiologia ovariana e gametogênese, incluindo a maturação oocitária, esteroidogênese e função do corpo lúteo (ISHIKAWA, 1993; SABATINI *et al.*, 1999; BEHRMAN *et al.*, 2001). Parece que o equilíbrio entre a produção de ROS e os mecanismos endógenos antioxidantes é um importante fator para a aquisição da habilidade de fertilização nos sistemas *in vitro* (DE LAMIRANDE *et al.*, 1997).

Já foi demonstrado que as ROS podem exercer efeitos benéficos na interação entre os gametas, e maléficis na motilidade espermática. A presença de ROS durante a fertilização é necessária para otimizar a interação oócito-espermatozóide (WOLF, 2005).

Todavia, a presença de ROS em excesso implica em diferentes tipos de injúrias celulares, incluindo peroxidação lipídica (fosfolípídeos de membrana), oxidação de aminoácidos e ácidos nucleicos, necrose e apoptose que podem subsequentemente diminuir a viabilidade da PIV de embriões (HALIWELL & GUTTERIDGE, 1992; JOHNSON & NARS ESFAHANI 1994; ALI *et al.*, 2003; KITAGAWA *et al.*, 2004). A presença de ROS tem sido relacionada com o bloqueio do desenvolvimento de embriões de mamíferos *in vitro*, sendo que efeitos deletérios na maturação oocitária também podem alterar a qualidade embrionária (GUÉRIN *et al.*, 2001).

A concentração intracelular de ROS aumenta em sistemas *in vitro*, visto que elevadas quantidades de  $O^{2-}$  e  $H_2O_2$  foram detectadas nos estágios iniciais de clivagem em embriões de ratos PIV (NARS-ESFAHANI, 1990; & NARS-ESFAHANI & JOHNSON, 1991; GOTO *et al.*, 1993; NODA; 1992). Os embriões produzidos e cultivados *in vitro* são mais susceptíveis aos danos oxidativos, visto que seus mecanismos de defesa são insuficientes para proteger sua delicada estrutura celular (AITKEN *et al.*, 1993).

Os oócitos utilizam oxigênio para produção de energia, através da fosforilação oxidativa nas mitocôndrias. Logo, estes são considerados a maior fonte de ROS e essa situação se agrava nos sistemas de MIV quando comparados com a condição *in vivo* (DELEUZE & GOUDET, 2010). A produção de ROS em embriões de ratos e bovinos aumenta durante o CIV sob elevada tensão de oxigênio (20%). Porém, quando cultivados sob baixa tensão de oxigênio (5-7%) melhoram a taxa de desenvolvimento embrionário em ambas as espécies (GUÉRIN *et al.*, 2001).

A produção de ROS varia de acordo com o estágio de desenvolvimento embrionário. Em ratos, o aumento da produção de ROS ocorre no momento da

fecundação e na transição G2/M do segundo ciclo celular, o que pode ser relacionado com o bloqueio do desenvolvimento embrionário *in vitro* (NARS-ESFAHANI & JOHNSON, 1991). Diversos fatores exógenos podem alterar a produção de ROS nos sistemas de PIV de embriões, como a elevada tensão de oxigênio durante o CIV, presença de cátions metálicos na água e/ou reagentes utilizados, exposição à luz visível, produção de ROS pelos espermatozoides durante a FIV, excesso de glicose e o processo de criopreservação/reaquecimento (GUÉRIN *et al.*, 2001).

Em suma, é evidente que o estresse oxidativo decorrente das técnicas de reprodução assistida não pode ser evitado. Porém, o excessivo estresse oxidativo durante a PIV pode ser superado através da redução na produção de ROS, utilizando-se reduzida tensão de oxigênio durante o CIV e/ou suplementação dos meios de cultivo com antioxidantes. Porém, a produção de ROS e os mecanismos antioxidantes devem estar em constante equilíbrio, visto que funções fisiológicas relacionadas à reprodução podem ser comprometidas.

### **Biossíntese da glutatona (GSH) e sua importância no oócito e no embrião**

A GSH é um tripeptídeo tiol (radical -SH) de baixo peso molecular e é o principal componente sulfidril não protéico presente nas células de mamíferos. A GSH age como o principal antioxidante não enzimático na eliminação das ROS e na manutenção do estado intracelular de redução-oxidação (redox), especialmente quando células são cultivadas sob elevada tensão de oxigênio (DE MATOS *et al.*, 1996; VIET LINH *et al.*, 2009; WOLF, 2005).

A GSH é sintetizada em oócitos e embriões bovinos a partir do estágio de 8-16 células, após a transição materno-zigótica (DE MATOS & FURNUS, 2000; TAKAHASHI *et al.*, 1993; LIM *et al.*, 1996; HAMMOND *et al.*, 2001). A GSH é formada pelos aminoácidos glutamato, cisteína e glicina, sendo que sua síntese é limitada pela presença da L-cisteína no meio extracelular. A síntese da GSH ocorre no citosol das células em duas etapas: primeiramente, a enzima  $\gamma$ -

glutamilcisteína sintetase catalisa a síntese da  $\gamma$ -glutamil-cisteína a partir do glutamato e da cisteína; posteriormente, na presença da GSH sintetase, a glicina é adicionada no terminal C da  $\gamma$ -glutamil-cisteína (DELEUZE & GOUDET, 2010).

A GSH se apresenta sob duas formas: reduzida com um grupo sulfidril (GSH), que é a forma predominante nas células (99,5%), ou oxidada, como um dissulfeto (GSSG). O conteúdo celular de GSH é regulado pelo ciclo  $\gamma$ - glutamil que tem como função a síntese e a manutenção do GSH na forma reduzida (WOLF, 2005).

Para neutralização das ROS ocorre a reação de redução de duas moléculas de GSH com uma molécula de  $H_2O_2$ , catalisada pela glutathione peroxidase (GPX), originando uma molécula de glutathione oxidada (GSSG) e duas de  $H_2O$ . Por sua vez, a GSSG é reduzida em GSH pela glutathione redutase na presença de NADPH (doador de elétrons) e desta forma, há manutenção do equilíbrio de GSH e GSSG na proporção de 100:1 dentro das células (DELEUZE & GOUDET, 2010).

A síntese de GSH durante a maturação oocitária *in vivo* é modulada pelas gonadotrofinas e está intimamente relacionada com a função das células do *cumulus oophorus*, que atuam no transporte da cisteína para o interior do oócito. Com a proximidade da ovulação e ocorrência do pico de LH, há aumento da concentração dos estoques de GSH no oócito, possibilitando a proteção futura contra os danos oxidativos durante a fecundação e desenvolvimento embrionário inicial (WOLF, 2005; TAKAHASHI *et al.*, 1993; DE MATOS *et al.*, 2002). Ainda, o aumento da GSH durante a maturação parece estar relacionado com a competência do oócito para o posterior desenvolvimento embrionário (AVELINO, 2004).

Durante o processo de fecundação, a GSH atua na descondensação da cabeça do espermatozóide e, conseqüentemente, na formação do pronúcleo masculino e ativação oocitária. Porém, durante a interação entre os gametas (oócito-espermatozóide), a GSH não deve estar presente no meio extracelular, visto que esse é um processo dependente da presença de ROS (WOLF, 2005).

Após a transição materno-zigótica (8-16 células) o embrião é capaz de sintetizar suas próprias proteínas. Durante o desenvolvimento embrionário o estado redox deve ser mantido, logo, a concentração de GSH deve ser satisfatória para que o embrião consiga suportar os danos relacionados com a ação das ROS (WOLF, 2005). Ainda, a concentração de GSH em embriões está intimamente correlacionada com o desenvolvimento inicial e viabilidade após a criopreservação (GUÉRIN *et al.*, 2001).

Além de atuar como antioxidante, a GSH atua no transporte de aminoácidos, principalmente a cisteína, na síntese protéica e de DNA e na redução de dissulfetos. Ainda, a GSH é requerida para a eliminação de peróxidos lipídicos e proteínas tioladas, controle da permeabilidade da membrana mitocondrial e remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em embriões (DE MATOS *et al.*, 2002; WOLF, 2005).

#### **Efeito da adição de antioxidantes nos meios de cultivo *in vitro***

Os sistemas biológicos desenvolveram diversos mecanismos para controlar os níveis de ROS, incluindo mecanismos enzimáticos (superóxido dismutase, catalase e peroxidases) e não enzimáticos (glutathione, vitaminas C e E, entre outros) (HALIWELL & GUTTERIDGE, 1989; CETICA *et al.*, 2001). Os transcritos de RNAm para a maioria dos antioxidantes enzimáticos já foram detectados em oócitos e embriões de mamíferos (HARVEY *et al.*, 1995; EL MOUATASSIM *et al.*, 1999; LEQUARRÉ *et al.*, 2001).

Componentes de tiol de baixo peso molecular, como a cisteamina e o β-mercaptoetanol, reduzem a cistina em cisteína, o que disponibiliza a captação de cisteína pelas células. Logo, a adição destes componentes nos meios de cultivo de desenvolvimento, como o β-mercaptoetanol, a cisteamina e/ou a cisteína, estimulam a síntese e aumentam a concentração intracelular de GSH (WOLF, 2005; TAKAHASHI *et al.*, 2002).

A presença de cisteína no meio de cultivo é fator limitante para a síntese de GSH pelo oócito e embrião. O meio de maturação comumente utilizado nos

sistemas de PIV de embriões, o TCM-199, possui baixa concentração de cisteína em sua composição (0,6  $\mu$ M). Além disso, a cisteína é rapidamente oxidada em cistina, o que por sua vez limita a síntese de GSH (WOLF, 2005). Devido a isso, a adição de cisteína no meio MIV é de grande interesse para aprimorar o sistema de PIV de embriões bovinos.

Por outro lado, o meio de cultivo de desenvolvimento embrionário SOFaa (“*Synthetic Oviduct Fluid*” suplementado com aminoácidos) não possui cisteína em sua composição. Mas após a transição materno-zigótica, os embriões são capazes de sintetizar suas próprias proteínas, incluindo o GSH necessário para proteção dos embriões contra os danos oxidativos até a fase inicial de desenvolvimento. Logo, a síntese *de novo* de antioxidantes é necessária para proporcionar condições de desenvolvimento do embrião até o estágio de blastocisto (DELEUZE & GOUDET, 2010). Desta forma, é de grande interesse aprimorar o sistema de CIV de embriões bovinos, fornecendo-lhes condições para melhorar a sua qualidade e viabilidade.

ALI *et al.* (2003) demonstraram que a suplementação com cisteína (0,6 mM) no meio de MIV ou CIV, durante as primeiras 72 horas de desenvolvimento, melhorou a taxa de mórulas e blastocistos quando comparado com embriões cultivados sem suplementação com antioxidantes. Ainda, a suplementação com cisteína,  $\beta$ -mercaptoetanol e cistina no meio MIV de oócitos bovinos melhorou a taxa de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (DE MATOS *et al.*, 1997).

O  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -ME), um composto de tiol de baixo peso molecular que atua como um agente redutor, é um antioxidante não enzimático. Ele interage diretamente com o radical hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ) e pode também quelar alguns íons metálicos que potencializam os danos oxidativos (HOSSEINI *et al.*, 2009). A adição de  $\beta$ -ME no meio de cultivo aumenta a proteção contra o estresse oxidativo durante o desenvolvimento embrionário e, conseqüentemente, melhora a taxa de produção de blastocistos (NEDAMBALE *et al.*, 2006).

O  $\beta$ -ME previne a oxidação da cisteína (precursor da GSH) em cistina, visto que a última não consegue ser captada pelos oócitos de mamíferos. Portanto, permite uma entrada maior da cisteína nas células e, conseqüentemente, o aumento na síntese intracelular de GSH, verificada pelo aumento nos níveis intracelulares de GSH (ALI *et al.*, 2003; CAAMAÑO *et al.*, 1996; 1998).

Alguns efeitos benéficos observados após adição de  $\beta$ -ME (100  $\mu$ M) no meio de cultivo *in vitro* são a redução da fragmentação do DNA, dos níveis de ROS e da mortalidade embrionária sob condições de estresse oxidativo (20% de  $O_2$ ) (TAKAHASHI *et al.*, 1993; TAKAHASHI *et al.*, 2002; CAAMAÑO *et al.*, 1998; FEUGANG *et al.*, 2004). Isto porque foi demonstrado que o efeito da adição de  $\beta$ -ME na maturação oocitária e desenvolvimento embrionário está correlacionado com o aumento nos níveis intracelulares de GSH (SÁ BARRETO, 2007).

Para modulação das ROS extracelulares pode-se suplementar os meios de CIV com antioxidantes enzimáticos extracelulares, como a superóxido dismutase (SOD) ou catalase. No entanto, os relatos na literatura são muito controversos em relação aos efeitos dos antioxidantes enzimáticos na neutralização das ROS na PIV de embriões (ALI *et al.*, 2003). Ainda de acordo com o mesmo autor, a suplementação com 5 ou 127 UI de catalase durante as primeiras 72 horas de CIV ou durante e MIV não melhorou as taxas de desenvolvimento embrionário. Já de acordo com ORSI & LEESE (2001), a suplementação do meio CIV com 100 UI de catalase melhorou o desenvolvimento embrionário, através da redução do conteúdo de  $H_2O_2$ .

Os efeitos da catalase são mais visíveis quando se realiza a microinjeção deste antioxidante em embriões pré-implantacionais. Ainda, os efeitos da catalase podem ser mascarados em decorrência da variação na composição de meios e nos sistemas de cultivo entre os diversos relatos na literatura (ORSI & LEESE, 2001).

A catalase é um antioxidante enzimático que atua removendo somente o  $H_2O_2$  extracelular. Logo, a atividade da catalase parece ser menos efetiva na remoção das ROS em oócitos e embriões. A enzima Mn-SOD, presente na

mitocôndria, atua como antioxidante removendo os radicais superóxidos e formando a espécie reativa de oxigênio  $H_2O_2$ , que posteriormente será removido pela GPX ou pela catalase (CORRÊA *et al.*, 2008).

De acordo com GUÉRIN *et al.* (2001) transcritos de catalase estão ausentes em oócitos em MII, mas estão presentes em blastocistos de ratos. Esse fato sugere que talvez a catalase seja efetiva apenas após a transição materno-zigótica. Ainda segundo o mesmo autor, sua efetividade já foi demonstrada, uma vez que a suplementação do meio de cultivo com catalase ou outros antioxidantes enzimáticos aumentou a taxa de blastocistos em coelhos, ratos e bovinos.

### **Controle de atmosfera gasosa durante a produção *in vitro* de embriões bovinos**

A tensão de oxigênio na condição *in vivo*, via irrigação capilar dos tecidos, exerce um importante papel no crescimento e atividade biossintética do folículo ovariano. Sabe-se que a concentração de oxigênio no interior do lúmen do trato reprodutivo de fêmeas é aproximadamente um terço (3-9%) daquela encontrada nos sistemas de PIV de embriões (LIM *et al.*, 1999; MASTROIANNI & JONES, 1965; WATSON *et al.*, 1994). A elevada pressão parcial de oxigênio (aproximadamente 20% de  $O_2$  atmosférico) durante o CIV de embriões bovinos resulta em aumento na produção de ROS (BAVISTER, 1995). Logo, na condição *in vivo* há proteção dos embriões contra os efeitos deletérios do estresse oxidativo. Em contrapartida, na condição *in vitro*, o fornecimento de oxigênio deve ser manipulado visando suprir as necessidades metabólicas dos oócitos (DIAS, 2003) e dos embriões.

De acordo com FEUGANG *et al.* (2003), o estresse oxidativo ocorre quando a produção de ROS é superior à eficiência dos mecanismos endógenos protetores. A elevada atmosfera de  $O_2$  induz a produção de mais ROS, o que por sua vez pode resultar em danos celulares (DIAS, 2003). Devido a isso, a utilização de baixa tensão de oxigênio (5-7%) nos sistemas de PIV promove a redução na produção de ROS, sendo correlacionada com taxas satisfatórias de

desenvolvimento embrionário (AUERBACH *et al.*, 1968; HAIDRI *et al.*, 1971; BAVISTER *et al.*, 1988; THOMPSON *et al.*, 1990; VOELKEL *et al.*, 1992; FUGITANI *et al.*, 1997; TAKAHASHI *et al.*, 2000).

Todavia, ainda não é claro se há necessidade da adição de antioxidantes ao meio em sistemas de cultivo de desenvolvimento embrionário em atmosfera com baixa concentração de O<sub>2</sub> (ALI *et al.*, 2003).

Desta forma, tanto a utilização de baixa concentração de O<sub>2</sub> como a adição de antioxidantes ao meio de cultura são efetivas na proteção contra os efeitos deletérios do estresse oxidativo, proporcionando boas condições de desenvolvimento embrionário (DIAS, 2003; LIM *et al.*, 1999; TAKAHASHI *et al.*, 2002; CAAMAÑO *et al.*, 1996; SÁ BARRETO, 2007). Um de nossos propósitos é avaliar os efeitos da adição de antioxidantes ao meio em sistemas de cultivo de desenvolvimento embrionário em atmosfera com baixa concentração de O<sub>2</sub>.

### **Apoptose em células embrionárias**

A apoptose, ou morte celular programada, é um processo fisiológico, visto que é essencial durante a embriogênese e morfogênese. Ela ocorre em condições normais do desenvolvimento de embriões *in vivo* e *in vitro* e é regulada por uma série de eventos bioquímicos e morfológicos. Neste processo são observadas algumas características no núcleo e citoplasma, tais como a fragmentação no DNA, o citoplasma se torna denso e com corpos apoptóticos e vesículas, há alteração na permeabilidade da membrana mitocondrial e aumento do retículo endoplasmático. Tais efeitos deletérios ocorrem em decorrência da presença de peróxidos, originados da peroxidação lipídica e oxidação de proteínas (WOLF, 2005; SÁ BARRETO, 2007).

Para detecção de apoptose pode-se utilizar a técnica de “*in situ terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick and labeling assay*” (TUNEL), onde a enzima *deoxinucleotidil transferase* adiciona nucleotídeos biotinizados marcados com fluoresceína no local de quebra da fita de DNA da célula em apoptose, podendo ser então visualizada por microscópio de epifluorescência. A

reação TUNEL detecta preferencialmente células que iniciaram o processo de morte celular. O índice de células em apoptose é um dos parâmetros que podem indicar a qualidade dos blastocistos produzidos (SÁ BARRETO, 2007).

A utilização de tensão suprafisiológica de oxigênio durante o cultivo embrionário pode acarretar em maior produção de ROS e, conseqüentemente, em maiores taxas de apoptose (VAN SOOM *et al.*, 2002). O acúmulo de superóxido e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em blastocistos parece estar relacionado com maiores taxas de apoptose. Porém, a utilização de antioxidantes enzimáticos reduz a porcentagem de células apoptóticas (GUÉRIN *et al.*, 2001). Portanto, a utilização de baixa tensão de oxigênio e a suplementação com antioxidantes no meio CIV acarretam em menor taxa de células apoptóticas proporcionalmente ao total de blastômeros.

### **Criopreservação e criotolerância de embriões PIV**

A criopreservação de embriões bovinos PIV oferece uma série de vantagens, como a preservação de material para o estabelecimento de bancos genéticos para uso futuro, armazenamento de embriões não transferidos, maior facilidade com relação ao intercâmbio comercial de animais/embriões entre diferentes regiões do território brasileiro ou mesmo com outros países, além de proporcionar a otimização do aproveitamento de gametas femininos.

A criopreservação visa manter o metabolismo celular em estado de quiescência, tornando possível a conservação de células e tecidos por tempo indeterminado. O primeiro sucesso desta técnica foi mencionado por WHITTINGHAM (1971), utilizando embriões de camundongos. Desde então muitas pesquisas têm sido realizadas para a criopreservação de embriões bovinos PIV, pois estes são mais sensíveis à criopreservação e possuem taxas de gestação significativamente menores, após a transferência, quando comparado com embriões produzidos *in vivo* e criopreservados (DOBRISNKY, 2002; HASLER *et al.*, 1995; FAIR *et al.*, 2001; MARTINEZ *et al.*, 2006).

IMAI *et al.* (2002) relataram que os embriões PIV são mais sensíveis às baixas temperaturas e possuem criotolerância inferior quando comparados

àqueles obtidos em condição *in vivo*. Este fato parece estar altamente correlacionado com o conteúdo lipídico intracitoplasmático de tais embriões, havendo diferenças tanto na quantidade como na composição lipídica (SEIDEL *et al.*, 2006). Isto ocorre porque o sistema de cultivo *in vitro* pode influenciar a morfologia e o metabolismo do oócito e do embrião (LONERGAN *et al.*, 2003a; RIZOS *et al.*, 2003). A aparência mais escura de embriões bovinos cultivados *in vitro* na presença de soro é atribuída ao aumento do conteúdo lipídico (ABE *et al.*, 2002), uma vez que ocorre a captação de lipídeos provenientes do soro por oócitos bovinos maturados *in vitro* (KIM *et al.*, 1997, GENICOT *et al.*, 2005). O aumento de lipídeos intracelulares compromete a qualidade dos embriões, aumentando a sua sensibilidade ao estresse oxidativo e à criopreservação (REIS *et al.*, 2003).

Devido ao fato de que a sensibilidade para refrigeração e criotolerância de oócitos e embriões de mamíferos está diretamente relacionada ao seu conteúdo lipídico (KIM *et al.*, 2001; ABE *et al.*, 2002; SEIDEL, 2006), recentes esforços tem focado a atenção na modificação da composição do meio de cultivo *in vitro* com a intenção de alterar o conteúdo lipídico em embriões PIV. Por exemplo, o cultivo de embriões na ausência de soro fetal resulta em menor acúmulo lipídico intracitoplasmático e, conseqüentemente, melhora a criotolerância dos mesmos (RIZOS *et al.*, 2003).

Devido ao aumento da concentração lipídica no citoplasma de embriões durante o CIV, observa-se a ocorrência de peroxidação lipídica durante os períodos de cultivo, criopreservação e de descongelamento. Após a criopreservação, os embriões PIV são ainda mais susceptíveis aos danos oxidativos, visto que sua estrutura ainda muito delicada não possui os mecanismos de defesa maduros (ALI *et al.*, 2002; NEDAMBALE *et al.*, 2006, HOSSEINI *et al.*, 2009). Observações feitas para espermatozoides bovinos demonstram que a congelação diminui os estoques de GSH em 78% e de SOD em 50%, o que sugere que o estresse oxidativo ocorre durante e/ou após o ciclo de congelação/descongelação. Esse fato pode explicar a menor viabilidade que ocorrem em oócitos/embriões após a

criopreservação (GUÉRIN *et al.*, 2001). Devido a isso, a suplementação com antioxidantes nos meio de CIV pode melhorar a viabilidade embrionária pós-congelação/vitrificação (NEDAMBALE *et al.*, 2006).

## Referências

- ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Mol Reprod Dev.**, v.61, p.57–66, 2002.
- AITKEN, R.J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potencial and human sperm function. **J. Reprod. Fertil.**, v.98, p.257-322, 1993.
- ALI, A.A.; BILODEAU, J.F.; SIRARD, M.A. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. **Theriogenology.**, v.59, p.939-988, 2003.
- ATTARAN, M.; PASQUALOTTO, E.; FALCONE, T; GOLDBERG, J.M.; MILLER, K.F.; AGARWAL, A.;SHARMA, R.K. The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of *in vitro* fertilization. **Int. J. Fert. Womens Med.**, v. 45, p.314-320, 2000.
- AUERBACH, S.; BRINSTER, R.L. Effect of oxygen concentration on the development of two-cell mouse embryos. **Nature.**, v.217, p.465-466, 1968.
- AVELINO, K.B. **Efeitos da estimulação e inibição da síntese de glutationa durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos sobre o desenvolvimento e viabilidade embrionária.** 2004. 93f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal)-Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.
- BANNAI, S.; CHRISTENSEN, H. N.; VADGAMA, J. V.; ELLORY, J. C.; ENGLERBERG, E.; GUIDOTTI, G. G.; *et al.* Amino acid transport systems. **Nature.**, v.311, p.308, 1984.
- BAVISTER, B.D. Role of oviductal secretions in embrionic growth *in vivo* and *in vitro*. **Theriogenology.**, v.29, p.143-154, 1988.
- BAVISTER, B.D. Culture of preimplantation embryos: facts and artefacts. **Hum. Reprod.**, v.1, p.91-148, 1995.
- BERHMAN, H.R.; KODAMAN, P.H.; PRESTON, S.L.; GAO, S. Oxidative stress on the ovary. **J. Soc. Gynecol. Investig.**, v.8, p.40-42, 2001.
- BETTERIDGE, K.J. Phylogeny, ontogeny and embryo transfer. **Theriogenology.**, v.44, p.1061-1098, 1995.

CAAMAÑO, J.N.; RYOO, Z.Y.; THOMAS, J.A.; YOUNGS, C.R.  $\beta$ -Mercaptoethanol enhances blastocysts formation rate of bovine *in vitro*-matured/*in vitro*-fertilized embryos. **Biol. Reprod.**, v.57, p.1179-1263, 1996.

CAAMAÑO, J.N.; RYOO, Z.Y.; YOUNGS, C.R. Promotion of development of bovine embryos produced *in vitro* by addition of cysteine and beta-mercaptoethanol to a chemically defined culture system. **J. Dairy Sci.**, v.55, p.1179-1263, 1998.

CETICA, P.D.; PINTOS, L.N.; DALVIT, G.C.; BECONI, M.T. Antioxidant enzyme system and oxidative stress in bovine oocyte *in vitro* maturation. **IUMBMB Life.**, v.51, p.57-64, 2001.

CORRÊA, G. A.; RUMPF, R.; MUNDIM, T. C. D.; FRANCO, M. M.; DODE, M. <sup>a</sup> N. Oxygen tension during *in vitro* culture of bovine embryos: Effect in production and expression of genes related with oxidative stress. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 132-142, 2008.

DE LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Rev. Reprod.**, v.2, p.48-54, 1997.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C; MOSES, D.F.; BALDASSARE, H. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocytes matured *in vitro*. **Mol. Reprod. Dev.**, v.42, p.432-438, 1995.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C; MOSES, D.F.; MARTINEZ, A.G.; MATKOVIC, M. Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. **Mol. Reprod. Dev.**, v.45, p.451-458, 1996.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C; MOSES, D. F. Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. **Biol. Reprod.**, v.57, p.1420-1425, 1997.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine *in vitro* maturation on embryo development effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. **Theriogenology.**, v.53, p.761-834, 2000.

DE MATOS, D.G.; HERRERA, C.; CORTVRINDT, R.; SMITZ, J.; VAN SOON, A.; NOGUIERA, D. Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation and embryo culture: a useful tool for increasing the efficiency of bovine *in vitro* embryo production. **Mol. Reprod. Dev.**, v.62, p.203-202, 2002.

DELEUZE, S.; GOUDET, G. Cysteamine supplementation of *in vitro* maturation media: a review. **Reprod. Dom. Anim.**, v.45, p.476-482, 2010.

DIAS, V.S. **Influência do suplemento de macromoléculas e da atmosfera gasosa na maturação oocitária e competência no desenvolvimento embrionário bovino.** 2003. 83f. Tese (Mestrado em Reprodução Animal)-Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

DOBRINSKY, J.R. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. **Theriogenology**, v.57, p.285-302, 2002.

EL MOUATASSIM, S.; GUÉRIN, P.; MÉNÉZO; Y. Expression of genes encoding antioxidants enzymes in human and mouse oocytes during the final stages of maturation. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 5, p.720-725, 1999.

FAIR, T.; LONERGAN, P.; DINNYES, A.; COTTELL, D.C.; HYTTEL, P.; WARD, F.A.; BOLAND, M.P. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. **Mol. Reprod. Dev.**, v.58, p.186-195, 2001.

FEUGANG, J.M.; VAN LANGENDONCKT, A.; SAYOUD, H.; REES, J.F.; PAMPFER, S.; MOENS, A.; et al. Effect of prooxidant agents added at the morula/blastocyst stage on bovine embryo development, cell death and glutathione content. **Zygote**, v.11, p.107-125, 2003.

FEUGANG, J.M.; DE ROOVER, R.; MOENS, A.; LÉONARD, S.; DESSY, F.; DONNAY, I. Addition of  $\beta$ -Mercaptoethanol or Trolox at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidants agents. **Theriogenology**, v.63, p.71-90, 2004.

FUGITANI, Y.; KASAI, K.; OHTANI, S.; NISHIMURA, K.; YAMADA, M.; UTSUMI, K. Effect of oxygen concentration and free radicals on *in vitro* development of *in vitro*-produced bovine embryos. **J. Anim. Sci.**, v.75, p.483-492, 1997.

FURNUS, C.C.; DE MATOS, D. G. The availability of cysteine in the culture medium appears to be the limiting factor for glutathione synthesis in mammalian oocytes. **Theriogenology**, v.51, p.373, 1999.

GENICOT, G.; LEROY, J.L.M.R.; VAN SOOM, A., DONNAY, I. The use of a fluorescent dye, Nile red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes. **Theriogenology**, v. 63, p. 1181–1194, 2005.

GOTO, Y.; NODA, Y.; MORI, T.; NAKANO, M. Increased generation of reactive oxygen species in embryo cultured *in vitro*. **Free Rad.Biol.Med.**, v.15, p.69-75, 1993.

- GUÉRIN, P.; MOUATASSIM, S.EL.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update.**, v.7, p.175-189, 2001.
- Haidri, A.A.; MILLER, I.M.; GWATKIN, R.B. Culture of mouse oocytes *in vitro*, using a system without oil and protein. **J. Reprod. Fert.**, v.26, p.409-411, 1971.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C.; CROSS, C.E. Review article: free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? **J. Lab.Clin. Med.**, v.119, p.598-620, 1992.
- HAMMOND, C.L.; LEE, T.K.; BALLATORI, N. Novel roles for glutathione in gene expression, cell death and membrane transport of organic solutes. **J. Hepatol.**; v.34, p.946-954, 2001.
- HARVEY, M.B.; ARCELLANA-PANLILIO, M.Y.; ZHANG, X.; SCHULTZ, G.A.; WATSON, A.J.. Expression of genes encoding antioxidants enzymes in preimplantation mouse and cow embryos and primary bovine oviduct cultures employed for embryo co-cultured. **Biol. Reprod.**, v.53, p.532-572, 1995.
- HASLER, M.B.; HENDERSON, W.B.; HURTGEN, P.J.; JIN, Z.Q.; MCCAULEY, A.D.; MOWER, S.A.; NEELY, B.; SHUEY, L.S.; STOKES, J.E.; TRIMMER, S.A. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. **Theriogenology.**, v.43, p.141-152, 1995.
- HOSSEINI, S.M.; FOROUZANFAR, M.; HAJIAN, M.; ASGARI, V.; ABEDI, P.; HOSSEINI, L.; et al. Antioxidant supplementation of culture medium during embryo development and/or after vitrification-warming: which is the most important? **J. Assist. Reprod.**,v.26, p.355-364, 2009.
- IMAI, K.; MATOBA, S.; DOCHI, O.; SHIMOHIRA, I. Different factors affect developmental competence and cryotolerance in *in vitro* produced bovine embryo. **Theriogenology.**, v.64, n.10, p.887-891, 2002.
- ISHIKAWA, W. Oxygen radicals-superoxide dismutase system and reproduction medicine. **Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi.**, v.45, p.842-848, 1993.
- JOENJE, H. Genetic toxicology of oxygen. **Mut. Res.**, v. 219, p.193-208, 1989.
- JOHNSON, M.H.; NARS-ESFAHANI, M.H. Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos *in vitro*? **Bioessays.**, v.16, p.31-39, 1994.
- KIM, K.S., KANG, J.K., KIM, H.S. Effects of cumulus cells, different cryoprotectants, various maturation stages and pre-incubation before insemination

on development capacity of frozen-thawed bovine oocytes. **Theriogenology.**, v.47, p.881-891, 1997.

KIM, J.Y.; KINOSHITA, M.; OHNISHI, M.; FUKUI, Y. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and *in vitro* matured bovine oocytes. **Reproduction.**, v.122, p.131-139, 2001.

KITAGAWA, Y.; SUZUKIB, K.; YONEDAA, A.; WATANABEA, T. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation on porcine embryos. **Theriogenology.**, v.62, p.1186-1283, 2004.

LEQUARRE, A.S.; FEUGANG, J.M.; MALHOMME, O.; DONNAY, I.; MASSIP, A.; et al. Expression of Cu/Zn and Mn superoxide dismutases during bovine embryo development: influence of *in vitro* culture. **Mol. Reprod. Dev.**, v.58, p.45-53, 2001.

LEESE HJ, DONNAY I, THOMPSON JG. Human assisted conception: a cautionary tale: lessons from domestic animals. **Hum. Reprod.**, v.13, p.184-202, 1998.

LIM, J.M.; LIOU, S.S.; HANSEL, W. Intracytoplasmatic glutathione concentration and the role of beta-mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryos. **Theriogenology.**, v.20, p.407-423, 1996.

LIM, J.M.; REGGIO, B.C.; GODKE, R.A.; HANSEL, W. Development of *in vitro*-derived bovine embryos cultured in 5% de CO<sub>2</sub> in air or in 5% O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub>. **Hum. Reprod.**, v.14, n.2, p.458-464, 1999.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M.P. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reprod Domest Anim.**,v.38, p.259–67, 2003a.

MARTÍNEZ, A.G.; VALCÁCEL, A.; FURNUS, C.C.; DE MATOS, D.G.; IORIO, G.; DE LAS HERAS, M.A. Cryopreservation of *in vitro* produced bovine embryos. **Small Rum. Res.**, v.63, p.288-296, 2006.

MASTRIOIANNI JR, L. & JONES, R. Oxygen tension in the rabbit fallopian tube. **J. Reprod. Fertil.**, v.9, p.99-102, 1965.

NARS-ESFAHANI, M.H.; AITKEN, J.R.; JOHNSON, M.H. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stages embryos developed *in vitro* or *in vivo*. **Development.**, v.109, p.501-508, 1990.

NARS-ESFAHANI, M.H.; JOHNSON, M.H. The origin of reactive oxygen species in mouse embryos cultured *in vitro*. **Development.**, v.113, p.551-611, 1991.

NEDAMBALE, T.; DU, F.; YANG, X.; TIAN, X. Higher survival rate of vitrified and thawed *in vitro* produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with beta-mercaptoethanol. **Anim. Reprod. Sci.**, v.93, p.61-75, 2006.

NODA, Y.; MATSUMOTO, H.; MAOKA, H.; TATSUMI, K.; KISHI, J.; MORI, T. Involvement of superoxide radicals in the mouse 2-cell block. **Mol. Reprod. Dev.**, v.28, p.356-260, 1991.

NODA, Y. Embryo development in vitro. **Assist. Reprod. Rev.**, v.2, p.9-15, 1992.

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

ORSI, N.M; and LEESE, H.J. Protection against reactive oxygen species during mouse preimplantation embryo development: role of EDTA, oxygen tension, catalase, superoxide dismutase and pyruvate. **Mol. Reprod. and Develop**, v.59, p.44-53, 2001.

PIERCE, J.D.; CACKLER, A.D.; ARNETT, M.G. Why should you care about free radicals? **RN.**, v.67, p.38-42, 2004.

REIS, A.; ROOKE, J.A.; McCALLUM, G.J.; EWEN, M.; STAINES, M.E.; LOMAX, M.A.; et al. Fatty acid content of polar and neutral lipids from bovine blastocysts produced *in vitro* in the presence or absence of serum. **Reproduction.**, v.30: (Abstr.), 2003.

RIZOS, D.; WARD, F.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. **Theriogenology.**, v.56, p.1-16, 2001.

RIZOS, D.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; PEREZ-GARNELO, S.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance and messenger of RNA expression. **Biol. Reprod.**, v.68, p.236-279, 2003.

SÁ BARRETO, L.S. **Avaliação dos efeitos da inibição da maturação nuclear e de antioxidantes sobre a maturação oocitária, fecundação e desenvolvimento embrionário bovino *in vitro***. 2007. 88f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal)- Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

SABATINI, L.; WILSON, C.; LOWER, A.; et al. Superoxide dismutase activity in human follicular fluid after controlled ovarian hyperstimulation in womem undergoing in vitro fertilization. **Fertil. Steril.**, v.72, p.1027-1034, 1999.

SAGARA, J.; MIURA, K.; BANNAI, S. Cystine uptake and glutathione level in fetal brain cells in primary culture and suspension. **J Neurochem.**, v.61, p.1667-1738, 1993.

SEIDEL, G.E. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. **Theriogenology.**, v.65, p.228-235, 2006.

SZCZEPANSK, M.; KOZLIK, J.; et al. Oxidative stress may be a piece in the endometriosis puzzle. **Fertil. Steril.**, v.79, p.1288-1293, 2003.

TAKAHASHI, M.; NAGAI, T.; HAMANO, S.; KUWAYAMA, M.; OKAMURA, N.; OKANO, A. Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos. **Biol. Reprod.**, v.49, p.228-264, 1993.

TAKAHASHI, M.; KEISHO, H.; TAKAHASHI, H.; OGAWA, H.; SCHULTZ, R.M.; OKANO, A. Effect of oxidative stress on development and DNA damage in *in vitro*-cultured bovine embryos by comet assay. **Theriogenology.**, v.54, p.137-145, 2000.

TAKAHASHI, M.; NAGAI, T.; OKAMURA, N.; TAKAHASHI, H.; OKANO, A. Promoting effect of beta-mercaptoethanol on *in vitro* development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos. **Biol. Reprod.**, v.66, p.562-569, 2002.

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

THOMPSON, J.G.E.; SIMPON, A.C.; PUGH, P.A; DONNELLY, P.E.; TERVIT, H.R. Effect of oxygen concentration on *in vitro* development of preimplantation sheep and cattje embryos. **J. Reprod. Fertil.**, v.89, p.573-578, 1990.

VAN SOOM, A.; YUAN, Y.K.; PEELMAN, L.J.; DE MATOS, D.G.; LAEVENS, H.; DE KRUIF, A. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tension with or without cysteine addition. **Theriogenology.**, v.57, p.1453-1518, 2002.

VIET LINH, N.; DANG-NGUYEN, T.Q.; NGUYEN, B.X.; MANABE, N.; NAGAI, T. Effects of cysteine during *in vitro* maturation of porcine oocytes under low oxygen tension on their subsequent *in vitro* fertilization and development. **J. Reprod. and Develop.**, v.55, p.594-598, 2009.

VOELKEL, S.A.; HU, Y.V.; MOORE, K.; BONDIOLI, K.R. Freeze survival of bovine embryos produced by *in vitro* maturation, fertilization and culture of oocytes. **Theriogenology.**, v.37, p. 317 (abstr), 1992.

WARNER, R.H. Superoxide dismutase, aging and degenerative disease. **Free Radical Biol. and Med.**, v.17, n.3, p.249-258, 1994.

WATSON, A.J. WATSON, P.H.; WARNER, S.K.; ARMSTRONG, D.T.; SEAMARK, R.F. Preimplantation development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized ovine zygotes: comparison between co-culture on oviduct epithelial cell monolayers and culture under low oxygen atmospheres. **Biol. Reprod.**, v.50, p.715-724, 1994.

WHITTINGAM, D.G. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. **Nature**, v.233, p.125-126, 1971.

WOLF, A. **Estímulo da síntese de glutatona na maturação *in vitro* de oócitos bovinos e sua influência no desenvolvimento embrionário.** 2005. 101f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal)- Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

## **CAPÍTULO 2 – EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ANTIOXIDANTES E DA ATMOSFERA GASOSA EM DIFERENTES PERÍODOS DO CULTIVO *IN VITRO* SOBRE O DESENVOLVIMENTO E CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS**

**RESUMO** – O aumento intracelular de espécies reativas de oxigênio (do inglês, ROS), em decorrência da utilização de elevada tensão de oxigênio ou da redução dos estoques intracelulares de glutathiona (GSH) durante o cultivo *in vitro* (CIV) podem induzir ao estresse oxidativo, e conseqüentemente culminar com falha no desenvolvimento embrionário. O estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito da suplementação com antioxidantes (0,6 mM cisteína - CIST; 0,6 mM cisteína + 100 µM cisteamina - C+C; 100 UI catalase - CAT ou 100 µM de β-mercaptoetanol – β-ME), durante 3 ou 7 dias de CIV, e da atmosfera gasosa {5% CO<sub>2</sub> em ar (20% O<sub>2</sub>) ou atmosfera controlada (7% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> e 88% N<sub>2</sub>)} sobre o desenvolvimento e criotolerância embrionários, bem como níveis intracelulares de ROS produzidos durante o cultivo de embriões bovinos. Quando a suplementação com antioxidantes foi realizada durante 7 dias de CIV, a taxa de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocistos foi adversamente afetada (P<0,05) pelos tratamentos CIST (11,2%) e C+C (1,44%), em relação ao Controle (26,6%), e pela tensão de oxigênio (17,2% e 11,11%; 20 e 7% O<sub>2</sub> respectivamente). Em relação à taxa de re-expansão embrionária, após reaquecimento e cultivo *in vitro* por 24 horas, não houve diferença significativa (P>0,05) entre os tratamentos avaliados (66,67% a 100%). Ao avaliar a suplementação durante 3 dias de CIV, as taxas de blastocistos não foram afetadas (P>0,05) pelos antioxidantes (43,66 a 48,5%), porém houve redução (P<0,05) nessas taxas na presença de baixa tensão de oxigênio (52,1% e 38,4%; 20 e 7% O<sub>2</sub> respectivamente). A qualidade dos embriões, que neste estudo foi avaliada pela mensuração dos níveis intracelulares de ROS pela coloração com H<sub>2</sub>DCFDA, não foi afetada (P>0,05) pela suplementação do meio com antioxidantes (0,95 a 0,78) ou pela tensão de

oxigênio (0,88 e 0,86; 20 e 7% O<sub>2</sub> respectivamente). Nenhuma diferença (P>0,05) foi observada nas taxas de re-expansão após reaquecimento de embriões entre os tratamentos avaliados (63,6 a 93,3%). Os resultados indicam que as ROS desempenham um importante papel na sinalização celular de diversos eventos fisiológicos visto que sua redução excessiva levou à parada do desenvolvimento embrionário *in vitro*. Podemos concluir que a suplementação com antioxidantes intracelulares durante todo o CIV foi deletéria ao desenvolvimento embrionário, bem como a utilização da atmosfera controlada. A suplementação durante 72 horas de CIV não promoveu diferença nas taxas de blastocistos e re-expansão, bem como na quantificação de ROS.

**Palavras-Chaves:** antioxidante, atmosfera gasosa, criotolerância, desenvolvimento embrionário, período de CIV

## Introdução

A produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos em larga escala é dependente da otimização dos processos que envolvem as etapas de maturação, fertilização e cultivo *in vitro* (CIV), bem como dos procedimentos que levem ao aprimoramento da qualidade e criotolerância embrionárias (RIZOS *et al.*, 2001).

Muitas diferenças foram demonstradas entre embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*, como por exemplo, número de células, conteúdo lipídico, criotolerância e anormalidades cromossômicas (CORRÊA *et al.*, 2008).

O potencial de desenvolvimento de embriões *in vitro* é influenciado, primeiramente, pela qualidade dos oócitos aspirados de folículos ovarianos (FUKUI & OYAMADA, 2004; LONERGAN *et al.*, 2003a). No entanto, as condições estabelecidas durante o CIV, no qual os embriões bovinos são expostos, também afetam a qualidade dos embriões PIV (TAKAHASHI *et al.*, 2002; VAN SOOM *et al.*, 2002; CORRÊA *et al.*, 2008). Ainda, vários fatores podem influenciar as condições de CIV, como a composição do meio, suplementação protéica, número de embriões cultivados e atmosfera gasosa (CORRÊA *et al.*, 2008).

Recentemente, as atenções foram voltadas para a investigação da importância do estado intracelular de redução-oxidação (redox), mais especificamente, do estresse oxidativo induzido pela utilização de elevada tensão de oxigênio durante diferentes etapas da PIV (FUKUI & OYAMADA, 2004). Embora, a tensão de oxigênio no trato reprodutivo feminino (3 a 9% O<sub>2</sub>; THOMPSON *et al.*, 1990; VOELKEL *et al.*, 1992) seja inferior à do ar (aproximadamente 20%), as condições de oxigênio atmosférico têm sido utilizadas rotineiramente para cultura de embriões de mamíferos. Tensões suprafisiológicas de oxigênio podem gerar a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HO·, ROO·) em excesso e, conseqüentemente, prejudicar o sucesso da PIV de embriões (BAVISTER, 1995; CORRÊA *et al.*, 2008).

Com o propósito de reduzir a produção de ROS, a utilização de baixa tensão de oxigênio (5 a 7%) no CIV de embriões bovinos tem sido correlacionada

com taxas satisfatórias de desenvolvimento embrionário (FUJITANI *et al.*, 1997; TAKAHASHI *et al.*, 2000).

Já foi anteriormente demonstrado que o baixo desenvolvimento embrionário em ambiente com elevada tensão de O<sub>2</sub> pode ser restaurado pela adição de antioxidantes ao meio de cultivo *in vitro* (GOTO *et al.*, 1993; NODA *et al.*, 1991), tais como cisteína (0,6 mM; ALI *et al.*, 2003), cisteamina (100 µM; DELEUZE & GOUDET, 2010), catalase (100 UI; ORSI & LEESE, 2001), β-mercaptoetanol (100 µM; HOSSEINI *et al.*, 2009), dentre outros. Ainda, a presença de células do *cumulus* é muito benéfica para o desenvolvimento embrionário em ambiente com elevada tensão de O<sub>2</sub>, visto que estas secretam agentes neutralizantes, como antioxidantes e quelantes de metais pesados, além de atuarem no transporte de precursores para a síntese de glutathiona (GSH) (CORRÊA *et al.*, 2008). A GSH atua na manutenção do estado redox na célula protegendo-as contra os danos oxidativos (JOHNSON & NARS-ESFAHANI, 1994; DELEUZE & GOUDET, 2010). A síntese desta molécula ocorre em oócitos e embriões bovinos a partir do estágio de 8-16 células, após a transição materno-zigótica (DE MATOS & FURNUS, 2000; TAKAHASHI *et al.*, 1993; LIM *et al.*, 1996; HAMMOND *et al.*, 2001).

É evidente que o estresse oxidativo decorrente das técnicas de reprodução assistida não pode ser evitado. Todavia, o excessivo estresse oxidativo durante a PIV pode ser superado através da redução na produção de ROS, utilizando-se reduzida tensão de oxigênio durante o CIV e/ou suplementação dos meios de cultivo com antioxidantes. Porém, a produção de ROS e os mecanismos antioxidantes devem estar em constante equilíbrio, visto que funções fisiológicas relacionadas à reprodução podem ser comprometidas, tanto na presença de excesso como na diminuição extrema de suas concentrações. Uma vez que as ROS atuam como moléculas sinalizadoras em diversas reações celulares, a redução excessiva das mesmas pode acarretar em parada do desenvolvimento embrionário (DELEUZE & GOUDET, 2010; UFER *et al.*, 2010).

A necessidade da suplementação com antioxidantes durante o CIV, em condição de baixa tensão de oxigênio, ainda não está bem elucidada. Algumas

questões ainda necessitam ser compreendidas, tais como se a proteção deve ser extracelular ou intracelular e qual o período de suplementação necessário (ALI *et al.*, 2003). Sobretudo, pouca atenção tem sido dada ao efeito da adição de antioxidantes nos meios de maturação *in vitro* (MIV) e CIV sobre a criotolerância dos embriões bovinos (HOSSEINI *et al.*, 2009).

Desta forma, o presente estudo foi conduzido com intuito de determinar se a suplementação com antioxidantes intracelulares (cisteína, cisteína associado à cisteamina ou  $\beta$ -mercaptoetanol) ou extracelulares (catalase) durante 72 ou 168 horas de CIV, sob diferentes tensões de oxigênio (20% ou 7%), é benéfica ou prejudicial para o desenvolvimento, qualidade e criotolerância de embriões bovinos PIV. Mais especificamente, avaliou-se: desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto; mensuração dos níveis intracelulares de ROS; taxas de sobrevivência embrionária após o cultivo *in vitro* pós-reaquecimento.

## **Material e Métodos**

### **Reagentes químicos**

Os reagentes utilizados foram obtidos da empresa Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO), caso contrário encontram-se especificados. Todos os reagentes são testados para cultivo celular.

### **Obtenção e seleção de oócitos provenientes de ovários de abatedouro**

Ovários de bovinos abatidos nos frigoríficos da região de Araçatuba-SP foram retirados das carcaças, aproximadamente 20 minutos após o abate, mantidos em solução salina estéril a 30-35°C e transportados para o laboratório em caixas térmicas, não excedendo o limite de 6 horas desde o abate até o início das aspirações. Folículos de 3 a 8 mm de diâmetro foram puncionados manualmente com auxílio de agulha de calibre 18-G adaptada a seringa de 10 mL, ambas descartáveis. Todo o material aspirado foi transferido para tubos plásticos

de 50 mL, os quais permaneceram em repouso (decantação) por 15 minutos para posterior seleção dos complexos *cumulus*-oócitos (COCs). O sedimento foi transferido para placas de poliestireno de 60 mm de diâmetro e avaliado em microscópio estereoscópico. Os COCs circundados com pelo menos quatro camadas de células do *cumulus* compactas e com citoplasma contendo granulação homogênea foram selecionados para o cultivo de maturação.

### **Maturação *in vitro* dos oócitos**

Os COCs selecionados foram lavados duas vezes em meio de lavagem H-199, constituído por TCM199 (Gibco BRL) suplementado com 0,2 mM de piruvato, 20 mM de HEPES, 5 mM de bicarbonato de sódio e 75 µg de gentamicina/mL. Posteriormente, foi lavado uma vez em meio de maturação B-199, constituído de TCM-199 suplementado com 0,2 mM de piruvato, 25 mM de bicarbonato de Sódio, 75 µg de gentamicina/mL, 0,5 µg de FSH/mL (Pluset®, Hertape Calier, Juatuba, MG, Brasil), 100 UI de hCG/mL (Vetecor®, Hertape Calier, Juatuba, MG, Brasil) e 10% de SFB (Gibco BRL), antes de serem transferidos para o cultivo de maturação.

Foram transferidos 50 COCs/poço da placa de cultivo (Costar® 3526, Corning Incorporated, NY, USA) contendo 500 µL de meio de maturação B-199. Os COCs foram maturados por 22 horas em estufa a 38,5°C, 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar.

### **Fertilização *in vitro***

Para os procedimentos de fertilização *in vitro* (FIV), foi utilizado o sêmen de um único touro Nelore da mesma partida. A palheta de sêmen foi descongelada à temperatura de 36°C por 40 segundos e o sedimento foi obtido por centrifugação em gradiente de densidade descontínua de Percoll (250 µL de Percoll 45% sobre 250 µL de Percoll 90%, em microtubo de 1,5 mL; Pharmacia, Uppsala, Sweden), durante 7 minutos a 2500xg em temperatura ambiente. O sedimento recuperado foi avaliado quanto ao volume, concentração e motilidade espermática. A

concentração final foi ajustada para  $25 \times 10^6$  de espermatozoides vivos por ml de meio fecundação (TALP-FIV) suplementado com 40  $\mu\text{L}/\text{mL}$  solução de PHE (1 mM de hipotaurina, 2 mM de penicilamina e 250 mM de epinefrina) e 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de heparina. Aproximadamente  $100 \times 10^3$  espermatozoides foram adicionados a cada gota de 100  $\mu\text{L}$  de meio TALP-FIV designado para cada grupo experimental. Os COCs foram lavados duas vezes em meio B-199 e uma vez em meio TALP-FIV. Foram adicionados 20 COCs por microgota de FIV, que foram co-incubados com os espermatozoides a  $38,5^\circ\text{C}$ , por 18-24 horas, em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  em ar.

### **Cultivo embrionário *in vitro***

O cultivo de desenvolvimento foi realizado nas mesmas placas de poços utilizadas durante a MIV (Costar® 3526, Corning Incorporated, NY, USA). Foram transferidos 50 COCs/poço da placa de cultivo contendo 500  $\mu\text{L}$  de meio “Synthetic Oviduct Fluid” (SOF) suplementado com 0,2 mM de L-glutamina, 0,34 mM de citrato de sódio, 2,8 mM de myo-inositol, 2% de BEM aminoácidos essenciais, 1% de MEM aminoácidos não essenciais, 0,5% de BSA e 2,5% de SFB. O CIV foi conduzido em incubadora com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  em ar, ou em sacos transparentes de polipropileno (“bags”) vedados e inflados com a mistura gasosa (7%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$  e 88%  $\text{N}_2$ ; White Martins, São Paulo, SP, Brasil), em temperatura de  $38,5^\circ\text{C}$  e umidade de 100% por 7 dias (168 hpi).

No Experimento 1, após 72 horas do cultivo, 50% do meio de cultivo foi renovado. Já no Experimento 2, as 72 hpi, o meio de cultivo foi totalmente renovado por meio SOF sem a suplementação com antioxidantes. Em ambos, a clivagem foi avaliada 72 horas pós-inseminação (D3), e o desenvolvimento embrionário avaliado às 168 hpi (D7).

### **Vitrificação e Reaquecimento dos embriões**

Os procedimentos utilizados para vitrificação e reaquecimento foram realizados de acordo com o protocolo Vitri-Ingá® (Ingámed, Paraná, Brasil), sendo os meios adquiridos desta empresa.

Os blastocistos expandidos obtidos no dia 7 do CIV de grau 1 e 2, classificados de acordo com o Manual da IETS (WRIGHT, 2009) foram selecionados para vitrificação. Os embriões foram lavados duas vezes em solução de manutenção sem crioprotetores (“Holding”) antes de serem transferidos para a solução VI-I de vitrificação, durante 5 minutos a 37°C. Posteriormente, foram transferidos para solução VI-II, durante 60 segundos em temperatura ambiente. Os embriões foram então depositados na porção final da haste de vitrificação com o mínimo volume de meio. Os protetores das hastes foram colocados horizontalmente no vapor de nitrogênio (N<sub>2</sub>) líquido por alguns minutos antes de iniciar o procedimento, para então serem mergulhados verticalmente de modo a ficarem totalmente submersos. Finalmente, as hastes contendo os embriões foram introduzidas no protetor, sendo então armazenadas em botijões criogênicos até o momento do uso nas etapas posteriores.

Para reaquecimento dos embriões, as hastes foram retiradas do N<sub>2</sub> e a extremidade contendo os embriões foi imersa em solução DV-I de desvitrificação durante 1 minuto, a 37°C, até que a microgota fosse desfeita. Em seguida, os embriões foram transferidos para a solução DV-II por 3 minutos em temperatura ambiente e, finalmente, para a solução DV-III por 10 minutos em temperatura ambiente. Por fim, foram lavados duas vezes em solução de lavagem em temperatura ambiente e cultivados em meio SOFaa por 24 horas em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> em ar. Ao final do período, foram avaliadas as taxas de re-expansão embrionária (sobrevivência *in vitro*) e eclosão.

### **Mensuração do conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelo ensaio com diclorofluoresceína**

Os níveis intracelulares de ROS (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HO·, ROO·) foram quantificados através da utilização da sonda fluorescente diacetato de 6-carboxi-2',7'-

diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA; Molecular Probes, Invitrogen, Oregon, USA) de acordo com BAIN et al (2011). Resumidamente, os embriões foram lavados duas vezes em PBS e incubados em 5 µM de H<sub>2</sub>DCFDA durante 30 minutos no escuro, a 38,5°C e 5% CO<sub>2</sub> em ar. Posteriormente, foram lavados duas vezes em PBS. Os embriões corados foram avaliados imediatamente em microscópio invertido de epifluorescência (Olympus, IX51), sob excitação de 495 nm e emissão de 520 nm, e analisados pelo programa Q-Capture Pro Image software (Media Cybernetics, Inc., Version 5.0.1.26). Os valores da intensidade do sinal de fluorescência obtidos dos embriões analisados foram subtraídos da média dos valores do “background” obtidos nas imagens.

### **Delineamento experimental**

#### **Experimento I: Efeitos da suplementação com antioxidantes e da atmosfera gasosa durante todo o período de cultivo *in vitro* sobre o desenvolvimento, qualidade e criotolerância de embriões PIV**

Neste estudo foram avaliados os efeitos da suplementação com antioxidantes até 168 hpi (D7) e da tensão *in vitro* de O<sub>2</sub> durante o CIV. Posteriormente, blastocistos expandidos graus I e II foram destinados à vitrificação.

Os embriões foram cultivados em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> em ar atmosférico ou em mistura de gases. O meio CIV foi suplementado ou não com diferentes antioxidantes, como se segue: 1) SOF sem suplementação sem antioxidantes (Controle); 2) SOF suplementado com 0,6 mM de cisteína (C); 3) SOF suplementado com 0,6 mM de cisteína associado à 100 µM de cisteamina (C+C); 4) SOF suplementado com 100 UI de catalase (CAT). Desta maneira, o estudo obedeceu a um esquema fatorial 4x2 (4 tratamentos e 2 atmosferas, num total de 8 grupos experimentais; Figura 1).

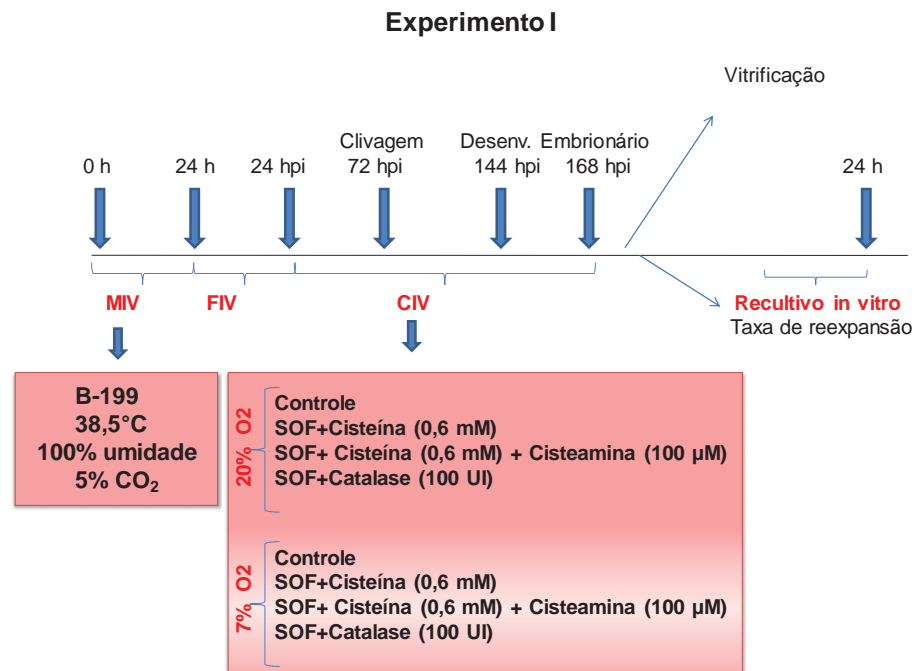


Figura 1. Atividades desenvolvidas no Experimento I.

**Experimento II: Efeitos da suplementação com antioxidantes e da atmosfera gasosa durante 72 horas do cultivo *in vitro* sobre o desenvolvimento, qualidade e criotolerância de embriões PIV**

Neste estudo foram avaliados os efeitos da suplementação com antioxidantes até 72 hpi (D3) e da tensão *in vitro* de O<sub>2</sub> durante o CIV. Ao final do cultivo (D7), os blastocistos expandidos graus I e II foram destinados à vitrificação e os blastocistos e blastocistos iniciais foram submetido à coloração para mensuração de ROS.

Os embriões foram cultivados em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> em ar atmosférico ou em mistura de gases. O meio CIV foi suplementado ou não com diferentes antioxidantes, como se segue: 1) SOF sem suplementação sem antioxidantes (Controle); 2) SOF suplementado com 0,6 mM de cisteína (C); 3) SOF suplementado com 0,6 mM de cisteína associado à 100 µM de β-mercaptoetanol (β-ME); 4) SOF suplementado com 100 UI de catalase (CAT).

Desta maneira, o estudo obedeceu a um esquema fatorial 4x2 (4 tratamentos e 2 atmosferas, num total de 8 grupos experimentais; Figura 2).

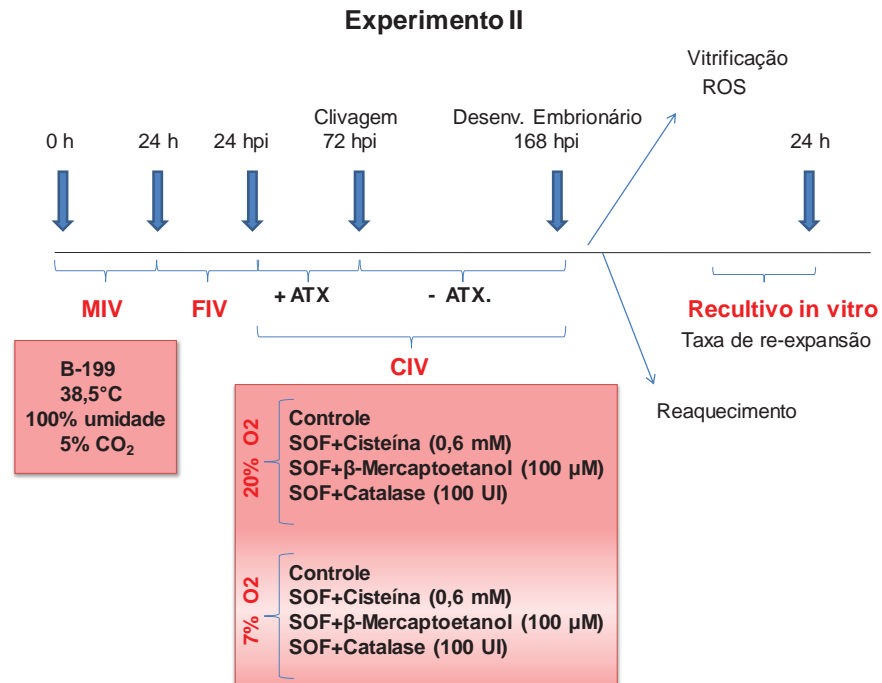


Figura 2. Atividades desenvolvidas no Experimento II.

### Análise Estatística

Cada experimento foi repetido no mínimo 5 vezes para cada avaliação proposta, em replicatas independentes. Em cada replicata, foi utilizado um poço da placa de cultivo celular com 50 óocitos para cada grupo experimental, sendo que o poço foi considerado a unidade experimental. A taxa de blastocistos foi calculada sobre o total de óocitos maturados.

Os dados foram analisados pela fração de embriões cultivados atingindo os estádios determinados, reportada em termos de porcentagem. As porcentagens foram transformadas utilizando arco seno raiz quadrada e os dados transformados foram analisados por PROC-GLM, considerando um modelo estatístico que inclui o tratamento (suplemento do meio de cultivo), a atmosfera e possíveis interações. Para comparações entre os grupos, a análise de variância foi utilizada nas variáveis contínuas. O estudo comparativo entre variáveis binomiais foi avaliado

pelo teste do Qui-quadrado. Diferenças com probabilidades (P) menores que 0,05 foram consideradas significativas.

As análises foram realizadas pelo programa SAS (Statistical Analysis System) 9.0.

## **Resultados**

### **Experimento I**

Os valores das taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário até a fase de blastocistos para os diferentes tratamentos estão representados na Tabela 1. Como não houve interação ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos (Controle, CIST, C+C, CAT) e a tensão de oxigênio (20 ou 7%  $O_2$ ), os resultados se encontram apresentados separadamente, como variáveis independentes.

**Tabela 1.** Clivagem e desenvolvimento de embriões cultivados *in vitro* em meio suplementado com diferentes antioxidantes (cisteína, cisteína + cisteamina ou catalase), até o D7 (168 hpi).

Tratamentos	Tensão de oxigênio	Nº de oócitos	Clivagem (% média ± EPM)	Blastocistos (168 hpi) (% média ± EPM)
Controle	20% O <sub>2</sub>	274	84,9% ± 3,63	32,6% ± 4,12
	7% O <sub>2</sub>	208	71,0% ± 3,63	20,5% ± 4,12
CIST	20% O <sub>2</sub>	284	79,8% ± 3,63	13,1% ± 4,12
	7% O <sub>2</sub>	224	72,4% ± 3,63	9,3% ± 4,12
C+C	20% O <sub>2</sub>	257	73,9% ± 3,98	0,8% ± 4,52
	7% O <sub>2</sub>	210	70,6% ± 3,98	2,0% ± 4,52
CAT	20% O <sub>2</sub>	295	68,3% ± 3,63	22,4% ± 4,12
	7% O <sub>2</sub>	245	69,4% ± 3,63	12,6% ± 4,12
Total	-	1997	73,8%	14,2%

Clivagem e desenvolvimento embrionário *in vitro* de embriões cultivados em meio SOF suplementado ou não com antioxidantes até as 168 hpi sob diferentes atmosferas gasosas (20 ou 7% O<sub>2</sub>). Controle = embriões submetidos ao CIV sem suplementação com antioxidantes, CIST = embriões submetidos ao CIV com suplementação com cisteína 0,6 mM; C+C = embriões submetidos ao CIV com suplementação com cisteína 0,6 mM + cisteamina 100 µM; CAT = embriões submetidos ao CIV com suplementação com catalase 100 UI.

Quando foi avaliado o efeito da tensão de oxigênio, houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre a taxa de clivagem e de blastocistos (Tabela 2). A taxa de clivagem foi superior ( $P < 0,05$ ) para o grupo 20% O<sub>2</sub> (76,6%) em comparação com o grupo 7% O<sub>2</sub> (70,8%). De maneira semelhante, o desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto em D7 foi superior ( $P < 0,05$ ) para o grupo 20% O<sub>2</sub> (17,2%) em comparação com o grupo 7% O<sub>2</sub> (11,1%).

**Tabela 2.** Clivagem e desenvolvimento de embriões cultivados *in vitro* sob diferentes tensões de oxigênio.

Tensão de oxigênio	Nº Oócitos	Clivagem (%média ± EPM)	Blastocistos (168 hpi) (%média ± EPM)
20% O <sub>2</sub>	1110	76,6 ± 1,86 <sup>a</sup>	17,2 ± 2,11 <sup>a</sup>
7% O <sub>2</sub>	887	70,8 ± 1,86 <sup>b</sup>	11,1 ± 2,11 <sup>b</sup>
Total	1997	73,7%	14,2%

Clivagem e desenvolvimento embrionário (168 hpi) de embriões CIV sob diferentes tensões de oxigênio (20 ou 7% O<sub>2</sub>).

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

O efeito dos antioxidantes sobre o desenvolvimento embrionário está demonstrado na Tabela 3. A taxa de clivagem foi semelhante (P>0,05) entre todos os tratamentos (68,8 a 77,7%), com exceção do Controle (77,7%) e CAT (68,8%), que diferiram entre si (P<0,05). O desenvolvimento embrionário até a fase de blastocistos em D7 foi similar (P>0,05) entre os grupos Controle (26,6%) e CAT (17,5%), porém o grupo C+C (1,4%) e CIST (11,2%) foram inferiores (P>0,05) ao Controle (Tabela 3).

**Tabela 3.** Clivagem e desenvolvimento de embriões cultivados *in vitro* em meio suplementado com diferentes antioxidantes (cisteína, cisteína + cisteamina ou catalase), até o D7 (168 hpi).

Tratamentos	Nº Oócitos	Clivagem (%média ± EPM)	Blastocistos (168 hpi) (%média ± EPM)
Controle	482	77,7 ± 2,57 <sup>a</sup>	26,6 ± 2,91 <sup>a</sup>
CIST	508	76,1 ± 2,57 <sup>ab</sup>	11,2 ± 2,91 <sup>bc</sup>
C+C	467	72,2 ± 2,81 <sup>ab</sup>	1,4 ± 3,19 <sup>c</sup>
CAT	540	68,8 ± 2,57 <sup>b</sup>	17,5 ± 2,91 <sup>ab</sup>
Total	1997	73,7%	14,2%

Clivagem e desenvolvimento de embriões CIV em meios suplementados ou não com antioxidantes até 168 hpi. Controle = embriões submetidos ao CIV sem suplementação com antioxidantes, CIST = embriões submetidos ao CIV com suplementação com cisteína 0,6 mM; C+C = embriões submetidos ao CIV com suplementação com cisteína 0,6 mM + cisteamina 100 µM; CAT = embriões submetidos ao CIV com suplementação com catalase 100 UI.

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Em relação à taxa de re-expansão após desvitrificação e recultivo *in vitro* por 24 horas, não houve diferença significativa entre os tratamentos (P>0,05). O grupo experimental C+C 20% O<sub>2</sub> não pode ser avaliado visto que não foram obtidos embriões aptos à vitrificação (Tabela 4).

**Tabela 4.** Taxa de re-expansão após desvitrificação e recultivo *in vitro* por 24 horas de embriões CIV em meio suplementado com diferentes antioxidantes (cisteína, cisteína + cisteamina ou catalase), até o D7 (168 hpi), em diferentes tensões de oxigênio (20 ou 7% de O<sub>2</sub>).

Tratamentos	Tensão de oxigênio	Embriões vitrificados (N)	Embriões re-expandidos após 24 h de cultivo N (%)
Controle	20% O <sub>2</sub>	40	30 (75,0%) <sup>a</sup>
	7% O <sub>2</sub>	18	15 (83,3%) <sup>a</sup>
CIST	20% O <sub>2</sub>	14	11 (78,6%) <sup>a</sup>
	7% O <sub>2</sub>	4	3 (75,0%) <sup>a</sup>
C+C	20% O <sub>2</sub>	0	-
	7% O <sub>2</sub>	2	2 (100,0%) <sup>a</sup>
CAT	20% O <sub>2</sub>	18	12 (66,7%) <sup>a</sup>
	7% O <sub>2</sub>	12	9 (75,0%) <sup>a</sup>

Taxa de re-expansão de embriões produzidos *in vitro* e vitrificados após recultivo de 24 horas. Controle = embriões submetidos ao CIV sem suplementação com antioxidantes, CIST = embriões submetidos ao CIV com suplementação com cisteína 0,6 mM; C+C = embriões submetidos ao CIV com suplementação com cisteína 0,6 mM + cisteamina 100 µM; CAT = embriões submetidos ao CIV com suplementação com catalase 100 UI.

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste Qui-quadrado (P<0,05).

## Experimento II

Os valores das taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário até a fase de blastocistos para os diferentes grupos estão representados na Tabela 5. Como não houve interação entre tratamentos (Controle, CIST, β-ME, CAT) e tensão de oxigênio (20 ou 7% O<sub>2</sub>), os resultados estão apresentados separadamente, como variáveis independentes (P>0,05).

**Tabela 5.** Desenvolvimento de embriões cultivados *in vitro* em meio suplementado com diferentes antioxidantes (cisteína,  $\beta$ -mercaptoetanol ou catalase), até o D3 (72 hpi), em diferentes tensões de oxigênio (20 ou 7% de  $O_2$ ).

Tratamentos	Tensão de oxigênio	N° Oócitos	Clivagem (% média $\pm$ EPM)	Blastocistos (168 hpi) (% média $\pm$ EPM)
Controle	20% $O_2$	177	85,3 $\pm$ 3,40	55,9 $\pm$ 3,08
	7% $O_2$	130	83,8 $\pm$ 3,40	36,9 $\pm$ 3,08
CIST	20% $O_2$	192	85,4 $\pm$ 3,40	56,8 $\pm$ 3,08
	7% $O_2$	146	78,8 $\pm$ 3,40	37,7 $\pm$ 3,08
$\beta$ -ME	20% $O_2$	198	81,8 $\pm$ 3,40	49,5 $\pm$ 3,08
	7% $O_2$	157	76,4 $\pm$ 3,40	36,3 $\pm$ 3,08
CAT	20% $O_2$	199	81,4 $\pm$ 3,40	46,7 $\pm$ 3,08
	7% $O_2$	179	77,1 $\pm$ 3,40	41,9 $\pm$ 3,08
Total	-	1378	81,3%	46,0%

Clivagem e desenvolvimento embrionário *in vitro* de embriões cultivados em meio SOF suplementado ou não com antioxidantes até as 72 hpi sob diferentes atmosferas gasosas (20 ou 7%  $O_2$ ) e posteriormente cultivados em meio sem antioxidantes até 168 hpi. Controle = embriões submetidos ao CIV sem suplementação com antioxidantes, CIST = embriões submetidos ao CIV com suplementação com cisteína 0,6 mM;  $\beta$ -ME = embriões submetidos ao CIV com suplementação com  $\beta$ -mercaptoetanol 100  $\mu$ M; CAT = embriões submetidos ao CIV com suplementação com catalase 100 UI.

Houve efeito ( $P < 0,05$ ) da tensão de oxigênio sobre o desenvolvimento embrionário (Tabela 6), sendo que a tensão de 20%  $O_2$  proporcionou maiores taxas (52,1%) de desenvolvimento em comparação com a tensão de 7%  $O_2$  (38,4%).

Não houve efeito dos antioxidantes sobre o desenvolvimento embrionário ( $P > 0,05$ ), sendo que as taxas de clivagem e blastocistos variaram entre 79,4% a 84,7% e 43,7% a 47,9%, respectivamente (Tabela 7).

**Tabela 6.** Clivagem e desenvolvimento de embriões cultivados *in vitro* sob diferentes tensões de oxigênio.

Tensões de oxigênio	Nº Oócitos	Clivagem (%média ± EPM)	Blastocistos (168 hpi) (%média ± EPM)
20% O <sub>2</sub>	766	83,4 ± 1,70 <sup>a</sup>	52,1 ± 1,54 <sup>a</sup>
7% O <sub>2</sub>	612	78,8 ± 1,70 <sup>a</sup>	38,4 ± 1,54 <sup>b</sup>
Total	1378	81,3%	46,0%

Clivagem e desenvolvimento embrionário (168 hpi) de embriões CIV em diferentes tensões de oxigênio, 20 ou 7% O<sub>2</sub>.

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

**Tabela 7.** Clivagem e desenvolvimento de embriões cultivados *in vitro* em meio suplementado com diferentes antioxidantes (cisteína, β-mercaptoetanol ou catalase), até o D3 (72 hpi).

Tratamentos	Nº Oócitos	Clivagem (%média ± EPM)	Blastocistos (168 hpi) (%média ± EPM)
Controle	307	84,7 ± 2,40 <sup>a</sup>	47,9 ± 2,18 <sup>a</sup>
CIST	338	82,5 ± 2,40 <sup>a</sup>	48,5 ± 2,18 <sup>a</sup>
β-ME	355	79,4 ± 2,40 <sup>a</sup>	43,7 ± 2,18 <sup>a</sup>
CAT	378	79,4 ± 2,40 <sup>a</sup>	44,4 ± 2,18 <sup>a</sup>
Total	1378	81,3%	46,0%

Clivagem e desenvolvimento embrionário de embriões CIV em meios suplementados ou não com antioxidantes até 168 hpi. Controle = embriões submetidos ao CIV sem suplementação com antioxidantes, CIST = embriões submetidos ao CIV com suplementação com cisteína 0,6 mM; β-ME = embriões submetidos ao CIV com suplementação com β-mercaptoetanol 100 μM; CAT = embriões submetidos ao CIV com suplementação com catalase 100 UI.

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Com relação à quantificação intracelular de ROS, mensurado em unidades arbitrárias de fluorescência emitida pela coloração com H<sub>2</sub>DCFDA, a análise não demonstrou interação (P>0,05) entre tratamentos (Controle, CIST, β-ME, CAT) e a tensão de oxigênio. Desta forma, estes resultados estão apresentados separadamente como variáveis independentes (Tabelas 8 e 9).

Não houve efeito (P>0,05) da tensão de oxigênio (Tabela 8) ou de antioxidantes (Tabela 9) sobre os níveis intracelulares de ROS.

**Tabela 8.** Níveis intracelulares de ROS em embriões bovinos cultivados *in vitro* sob diferentes tensões de oxigênio.

Tensão de oxigênio	Nº embriões avaliados	Unidades arbitrárias de fluorescência (Média ± EPM)
20% O <sub>2</sub>	166	0,88 ± 0,02 <sup>a</sup>
7% O <sub>2</sub>	84	0,86 ± 0,04 <sup>a</sup>
Total	250	-

Mensuração de ROS em unidades de fluorescência arbitrárias pela coloração H<sub>2</sub>DCFDA de embriões CIV sob diferentes tensões de oxigênio (20 ou 7% O<sub>2</sub>).

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

**Tabela 9.** Níveis intracelulares de ROS em embriões bovinos cultivados *in vitro* com diferentes antioxidantes.

Tratamentos	Nº embriões avaliados	Unidades arbitrárias de fluorescência (Média ± EPM)
Controle	50	0,95 ± 0,06 <sup>a</sup>
CIST	87	0,92 ± 0,05 <sup>a</sup>
β-ME	51	0,78 ± 0,04 <sup>a</sup>
CAT	62	0,83 ± 0,04 <sup>a</sup>
Total	250	-

Mensuração de ROS em unidades de fluorescência arbitrárias pela coloração H<sub>2</sub>DCFDA de embriões CIV em meios suplementados ou não com antioxidantes. Controle = embriões submetidos ao CIV sem suplementação com antioxidantes, CIST = embriões submetidos ao CIV com suplementação com cisteína 0,6 mM; β-ME = embriões submetidos ao CIV com suplementação com β-mercaptoetanol 100 μM; CAT = embriões submetidos ao CIV com suplementação com catalase 100 UI.

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

As taxas de re-expansão embrionária após reaquecimento e recultivo *in vitro* por 24 horas podem ser visualizadas na Tabela 10. Não foi verificada diferença (P>0,05) entre o Controle e os diversos tratamentos dentro da mesma tensão de oxigênio (20% ou 7%). A comparação entre os grupos demonstrou diferença apenas entre os tratamentos CIST (93,3%) e CAT (63,6%), em tensão de 7% de oxigênio (P<0,05).

Não houve diferença ( $P>0,05$ ) ao se comparar cada tratamento nas diferentes tensões de oxigênio (por exemplo, SOF 20% O<sub>2</sub> não diferiu de SOF 7% O<sub>2</sub>).

**Tabela 10.** Taxa de re-expansão após desvitrificação e recultivo *in vitro* por 24 horas de embriões CIV em meio suplementado com diferentes antioxidantes (cisteína,  $\beta$ -mercaptoetanol, catalase) até o D3 (72 hpi), em diferentes tensões de oxigênio (20 ou 7% de O<sub>2</sub>).

Tratamentos	Tensões de oxigênio	Nº embriões vitrificados	Re-expansão 24 h N (%)
Controle	20% O <sub>2</sub>	46	35 (76,1%) <sup>ab</sup>
$\beta$ -ME	20% O <sub>2</sub>	47	33 (70,2%) <sup>ab</sup>
CIST	20% O <sub>2</sub>	39	31 (79,5%) <sup>ab</sup>
CAT	20% O <sub>2</sub>	22	15 (68,2%) <sup>ab</sup>
Controle	7% O <sub>2</sub>	20	18 (90,0%) <sup>ab</sup>
$\beta$ -ME	7% O <sub>2</sub>	21	14 (66,7%) <sup>ab</sup>
CIST	7% O <sub>2</sub>	15	14 (93,3%) <sup>a</sup>
CAT	7% O <sub>2</sub>	22	14 (63,6%) <sup>b</sup>
Total	-	232	174 (75,7%)

Taxa de re-expansão de embriões produzidos *in vitro* e vitrificados após recultivo de 24 horas. Controle = embriões submetidos ao CIV sem suplementação com antioxidantes, CIST = embriões submetidos ao CIV com suplementação com cisteína 0,6 mM;  $\beta$ -ME = embriões submetidos ao CIV com suplementação com  $\beta$ -mercaptoetanol 100  $\mu$ M; CAT = embriões submetidos ao CIV com suplementação com catalase 100 UI.

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste Qui-quadrado ( $P<0,05$ ).

## Discussão

O CIV geralmente é conduzido em atmosfera gasosa superior àquela presente nas condições *in vivo*, o que pode resultar no aumento da produção de ROS. O excessivo acúmulo de ROS ou a redução dos estoques intracelulares de GSH podem levar ao desequilíbrio do estado redox e bloqueio do desenvolvimento embrionário *in vitro* (FUKUI & OYAMADA, 2004). Com intuito de reduzir a produção de ROS em sistemas de CIV, pode-se utilizar uma reduzida tensão de

oxigênio. Outra alternativa utilizada, visando aumentar a proteção intracelular contra os efeitos deletérios das ROS, é realizar a suplementação do meio de cultivo com diferentes antioxidantes (GOTO *et al.*, 1993; NODA *et al.*, 1991). Porém, ainda não está bem elucidado se há necessidade da suplementação com antioxidantes em condições de baixa tensão de oxigênio (5-7%), ou ainda se a proteção deve ser intracelular ou extracelular (ALI *et al.*, 2003).

Os resultados do presente estudo demonstraram redução das taxas de desenvolvimento de embriões cultivados sob baixa tensão de oxigênio. Contrariamente aos nossos resultados, alguns estudos demonstraram efeito benéfico de tensões reduzidas sobre as taxas de desenvolvimento embrionário *in vitro* (THOMPSON *et al.*, 1990; VOELKEL *et al.*, 1992; FUGITANI *et al.*, 1997; OLSON & SEIDEL; 2000; TAKAHASHI *et al.*, 2000; GUÉRIN *et al.*, 2001; KITAGAWA *et al.*, 2004). Diferenças entre os meios utilizados durante o cultivo e as condições de incubação estabelecidas podem explicar a inconsistência entre os nossos resultados e os dados encontrados na literatura. Sabe-se que meios de cultivo suplementados com soro, como no presente estudo, têm uma capacidade antioxidante superior em relação a meios com ausência dessa fonte protéica (LEMINSKA *et al.*, 2007). Mesmo a albumina sérica bovina (BSA), muitas vezes utilizada em complementação ou em substituição ao soro, também pode atuar como um agente antioxidante, uma vez que age quelando metais pesados presentes no meio (ORSI & LEESE, 2001).

Ainda, outro fator que pode explicar a redução das taxas de desenvolvimento de embriões cultivados sob baixa tensão de oxigênio é a utilização das “bags” durante o cultivo. Diferentes sistemas foram desenvolvidos visando garantir a baixa tensão de oxigênio durante o cultivo, dentre eles podemos citar a câmara incubadora e as “bags”. De acordo com ARIAS *et al.* (2011), ao comparar tais sistemas, a câmara incubadora foi superior aos “bags” em relação ao desenvolvimento e qualidade embrionários, já que nesta última foram observados maiores níveis intracelulares de ROS, de células apoptóticas, bem como a expressão de genes correlacionados com o estresse oxidativo. Portanto,

nas condições estabelecidas no nosso laboratório, é possível que a utilização de baixa tensão de oxigênio, associada a tais fatores acima mencionados, possa ter influenciado no metabolismo e no potencial redox dos embriões, com redução acentuada na concentração fisiológica de ROS, interferindo assim no crescimento e desenvolvimento embrionário *in vitro* (KARJA *et al.*, 2006).

Por outro lado, em concordância com nossos achados, alguns estudos demonstram não haver efeito algum da utilização da baixa tensão de oxigênio sobre a taxa de desenvolvimento embrionário (KHURANA E NIEMANN, 2000; CORRÊA *et al.*, 2008; SOMFAI *et al.*, 2010) ou, ainda, um efeito negativo (VAN DER WESTERLAKEN *et al.*, 1992). Primeiro porque, independentemente da tensão de oxigênio utilizada nos sistemas de cultivo, nenhuma delas representa as mudanças dinâmicas na concentração de oxigênio que ocorrem no trato reprodutivo feminino (HARVEY *et al.*, 2007). Portanto, mesmo as melhores tentativas de incremento dos sistemas de PIV ainda estão longe de se assemelhar às situações *in vivo*. Outro fator prejudicial é que, com a utilização de baixa tensão de oxigênio os embriões não são co-cultivados com células do *cumulus*. Por esta razão, há aumento na manipulação embrionária para remoção destas células após a FIV, expondo os prováveis zigotos a um estresse que pode comprometer seu potencial de desenvolvimento (CORRÊA *et al.*, 2008). Ainda, é sabido que as células do *cumulus* atuam eliminando metabólitos tóxicos do meio de cultivo, além de secretarem diversos fatores embriotróficos (FUGITANI *et al.*, 1997). Portanto, o estresse oxidativo decorrente da elevada tensão de oxigênio durante o cultivo, pode ser minimizado com a utilização de co-cultivo com tais células, de maneira que a produção de embriões seja semelhante nos dois sistemas. Finalmente, outro fator a ser considerado é que as células do *cumulus* em co-cultivo com embriões reduzem a tensão de oxigênio no meio de cultivo, criando um microambiente de redução gradativa da tensão de oxigênio de fora (meio de cultivo) para dentro do embrião (CAROLAN *et al.*, 1995; KHURANA E NIEMANN *et al.*, 2000). Desta forma, todos estes efeitos discutidos podem ter mascarado um possível efeito benéfico da baixa tensão de oxigênio no sistema de cultivo *in vitro*.

Em suma, talvez o sistema de “bags” utilizado no presente estudo possa não ter sido o mais adequado para assegurar uma baixa tensão de oxigênio durante o CIV, de tal maneira que tenha refletido nas taxas de blastocistos inferiores às obtidas pela atmosfera padrão.

Com intuito de reduzir os efeitos deletérios das ROS, diversos antioxidantes como o  $\beta$ -mercaptoetanol (TAKAHASHI *et al.*, 1993; NEDAMBALE *et al.*, 2006; HOSSEINI *et al.*, 2009), cisteína (VAN SOOM *et al.*, 2002); cisteamina (TAKAHASHI *et al.*, 1993; DE MATOS *et al.*, 1996; DE MATOS *et al.*, 2002), vitamina E (OLSON & SEIDEL, 2000) e catalase (ORSI & LEESE, 2001) tem sido utilizados durante o cultivo de embriões.

A adição de antioxidantes com intuito de combater os efeitos deletérios do estresse oxidativo têm fornecido resultados muito contraditórios (NARSESFAHANI *et al.*, 1990; IWATA *et al.*, 1998; VAN SOOM *et al.*, 2002), muitas vezes sendo satisfatório apenas quando o sistema de cultivo estabelecido por si só é inadequado (HARVEY *et al.*, 2007). Porém, diversos relatos da literatura demonstram os benefícios da utilização de antioxidantes no cultivo *in vitro* (LIM *et al.*, 1996; CAAMAÑO *et al.*, 1996). Com base nos resultados do experimento I, a suplementação com antioxidantes intracelulares (cisteína associado ou não à cisteamina) durante todo o período de cultivo foi prejudicial para o desenvolvimento embrionário.

De forma semelhante VAN SOOM *et al.* (2002) descreveram redução na taxa de blastocistos com a suplementação com 0,6 mM de cisteína durante todo o período de CIV. De acordo com LIM *et al.* (1999), em bovinos, após o estágio de 8-16 células, que coincide com a transição materno-zigótica, há início da síntese *de novo* de GSH pelo embrião. Logo, pode ser hipotetizado que a suplementação com antioxidantes após esse período pode ter sido prejudicial ao desenvolvimento embrionário em decorrência da redução excessiva dos níveis intracelulares de ROS. Sabe-se que concentrações fisiológicas de ROS, principalmente de  $H_2O_2$ , atuam como moléculas sinalizadoras que podem influenciar em diversas funções celulares, como na produção de energia e proliferação celular no desenvolvimento

inicial de embriões, diferenciação celular e expressão gênica, sendo que essas reações são mediadas por fatores de transcrição responsivos ao equilíbrio redox (BETTS E MADAN, 2008; LOPES *et al.*, 2010). Ainda, flutuações nos níveis de ROS sinalizam mecanismos intrínsecos que regulam diversas funções celulares, particularmente no embrião pré-implantacional (HARVEY *et al.*, 2007). Por exemplo, os níveis de ROS aumentam significativamente em embriões com 2 células, quando comparados com oócitos e, posteriormente durante o CIV, há elevação gradual até o estágio de mórula. Em blastocistos, os valores de ROS começam a diminuir até alcançar níveis similares aos encontrados em oócitos (DALVIT *et al.*, 2005). Em suma, baixos níveis de ROS sinalizam proliferação e diferenciação celular, por outro lado, elevados níveis de ROS levam ao estabelecimento de morte celular (UFER *et al.*, 2010). Em decorrência dos resultados aqui apresentados, a suplementação com antioxidantes durante todo o período de cultivo *in vitro* foi prejudicial e, devido a isto, nos experimentos subsequentes a suplementação foi realizada até 72 hpi, período correspondente à ativação do genoma embrionário em bovinos.

Com base nos resultados obtidos no experimento II, o desenvolvimento embrionário *in vitro* não foi influenciado pela suplementação com antioxidantes durante 72 hpi, até a transição materno-zigótica, diferindo de alguns relatos da literatura (ALI *et al.*, 2003; DE MATOS *et al.*, 2002). O CIV é mais passível de exercer grande influência sobre a qualidade embrionária, visto que é a fase da PIV mais longa. Logo, a proteção dos embriões contra os danos decorrentes das ROS durante o CIV, através da adição de antioxidantes, pode contribuir consideravelmente para melhorar o desenvolvimento e qualidade embrionários, através do aumento dos estoques intracelulares de GSH (NEDAMBALE *et al.*, 2006) e da redução da fragmentação do DNA (FEUGANG *et al.*, 2004). Porém, como discutido anteriormente, a composição dos meios, como a presença de SFB e BSA, e a utilização de co-cultivo com células do *cumulus* podem mascarar o real efeito dos antioxidantes. Logo, pode-se especular que a produção de ROS e os mecanismos antioxidantes, intra e extracelulares, estavam em equilíbrio e que não

houve estabelecimento da condição de estresse oxidativo. Ainda, tais resultados demonstram que a suplementação com antioxidantes durante todo o período do CIV de embriões bovinos pode ser tóxica e prejudicial ao desenvolvimento embrionário, visto que a suplementação com antioxidantes durante até 72 hpi não gerou os mesmo resultados insatisfatórios observados na suplementação durante todo o período de cultivo.

No presente estudo, a suplementação com catalase não interferiu no desenvolvimento embrionário *in vitro*, visto que é um antioxidante extracelular e age eliminando as ROS produzidas pelo próprio meio. Ainda, os efeitos da catalase podem ser mascarados em decorrência de sua inabilidade de atravessar a membrana plasmática e conseqüentemente de remover os peróxidos de hidrogênio produzidos pelo próprio embrião (KOURIDAKIS & GARDNER, 1995). Em contrapartida, ORSI & LEESE (2001) relataram melhores taxas de blastocistos quando realizaram suplementação com 100 UI de catalase em meio KSOM, livre de glutamina, em atmosfera de 20% de O<sub>2</sub> melhorou as taxas de blastocistos. Como os antioxidantes atuam removendo as ROS por vias distintas, e sua ação pode ser influenciada pela composição do meio e pela tensão de oxigênio, é esperado que resultados conflitantes sejam encontrados na literatura. Ainda, seus efeitos são mais pronunciados em atmosfera de 20% de O<sub>2</sub> e em meio TCM 199, visto que o meio SOF já contém diversos fatores que possuem capacidade antioxidante como o piruvato, citrato, cistina, dentre outros (VAN SOOM *et al.*, 2002).

A elevada concentração dos níveis intracelulares de ROS, pela coloração com a sonda fluorescente H<sub>2</sub>DCFDA, pode ser correlacionada com o bloqueio do desenvolvimento embrionário *in vitro* em diversas espécies (BETTS E MADAN, 2008; BAIN *et al.*, 2011). Porém, as ROS, principalmente o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, atuam de maneira similar ao óxido nítrico (NO) como moléculas sinalizadoras em diversos processos fisiológicos, incluindo a proliferação e diferenciação celular, e expressão de genes correlacionados com a resposta oxidativa modulada (UFER *et al.*, 2010; LOPES *et al.*, 2010; BAIN *et al.*, 2011). Com base nos resultados do

experimento II, os níveis intracelulares de ROS não diferiram estatisticamente em relação às diferentes tensões de oxigênio adotadas durante o CIV, 20 ou 7% O<sub>2</sub>, corroborando com relatos da literatura (BAIN *et al.*, 2011), ou nos diferentes tratamentos, sendo que nos últimos houve redução numérica importante nos grupos β-mercaptoetanol e catalase. Todavia, a suplementação com β-mercaptoetanol e catalase reduziu os níveis de ROS de maneira consistente, porém não significativa. Logo, esse efeito biológico pode ser correlacionado com a melhor qualidade desses embriões PIV, que podem resultar em um acréscimo na taxa de concepção. Talvez, efeitos mais pronunciados poderiam ser observados se fossem utilizadas condições de cultivo livres de fatores com capacidade antioxidante. Nas condições estabelecidas no nosso laboratório em que foi utilizado meio SOFaa suplementado com 2,5% de SFB e 5 mg/ml de BSA, em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> em ar e com co-cultivo de células do *cumulus*, diversos sistemas antioxidantes foram avaliados. Possivelmente, a similaridade nos níveis intracelulares de ROS, entre as tensões de oxigênio e os diferentes tratamentos avaliados, obtidos podem ser em decorrência da multiplicidade de fatores avaliados na atmosfera padrão e no controle, respectivamente. Como já descrito anteriormente, as células do *cumulus* atuam como varredores eliminando metabólitos tóxicos do meio de cultivo além de secretarem diversos fatores embriotróficos (FUGITANI *et al.*, 1997). Logo, é possível que a presença das células do *cumulus* durante o CIV, em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> em ar, possa ter reduzido a tensão de oxigênio ao redor dos embriões e conseqüentemente a mensuração intracelular de ROS (HARVEY *et al.*, 2007), se equiparando com os níveis encontrados na condição de baixa tensão de oxigênio.

As condições estabelecidas durante o CIV de embriões bovinos podem afetar a qualidade e, conseqüentemente, a criotolerância de blastocistos PIV (HOSSEINI *et al.*, 2009), sendo que tais características são refletidas na alteração do padrão de expressão de genes correlacionados com estresse oxidativo, apoptose, junções GAP, proliferação e diferenciação celular, dentre outros (PEREIRA *et al.*, 2005). Entretanto, está bem elucidado que os embriões bovinos

PIV são mais sensíveis aos danos decorrentes da criopreservação e das ROS, o que os torna extremamente vulneráveis ao estresse osmótico e oxidativo, em decorrência da peroxidação lipídica e conseqüentemente das modificações espaciais das estruturas da membrana plasmática (NEDAMBALE *et al.*, 2006; GUÉRIN *et al.*, 2001). Porém, os resultados do presente estudo demonstraram que a suplementação com antioxidantes durante o período de cultivo *in vitro* não foi capaz de proteger os embriões do estresse oxidativo e de melhorar a criotolerância, já que a taxa de re-expansão não diferiu entre os grupos avaliados. Corroborando com os nossos resultados, HOSSEINI *et al.* (2009) demonstraram que a suplementação com  $\beta$ -mercaptoetanol durante todo o período de cultivo embrionário *in vitro* não resultou em melhora nas taxas de re-expansão embrionária, porém, estes autores demonstraram que a adição desse antioxidante no meio de cultivo *in vitro* pós-aquecimento melhorou a crioresistência em decorrência na redução da porcentagem de apoptose embrionária. Logo, a proteção contra os danos decorrentes da ação das ROS durante o cultivo embrionário *in vitro* pós-aquecimento, parece ser uma estratégia interessante para melhorar a criotolerância de embriões PIV vitrificados.

Em suma, a utilização de baixa tensão de oxigênio e a suplementação com antioxidantes intracelulares durante todo o período de CIV de embriões bovinos afetou adversamente a taxa de desenvolvimento até a fase de blastocistos, porém as taxas de sobrevivência embrionária *in vitro* pós-reaquecimento foram similares entre os grupos avaliados. Entretanto, a suplementação com antioxidantes, intracelulares e extracelulares, durante as primeiras 72 horas de CIV, não interferiu nas taxas de blastocistos e de re-expansão embrionária pós-vitrificação. Ainda, os níveis intracelulares de ROS foram semelhantes entre a elevada e baixa tensão de oxigênio, bem como, nos diferentes tratamentos avaliados. Desta forma, alterações no estado redox estão positivamente correlacionadas com o desenvolvimento embrionário inicial e a suplementação com antioxidantes durante todo o período do CIV pode ser considerada prejudicial.

**Conclusões**

Conclui-se que a utilização da atmosfera controlada em sistema de “bags”, bem como a suplementação do meio de cultivo com antioxidantes intracelulares durante todo o período de CIV, na presença de soro e albumina sérica bovina, foram deletérias ao desenvolvimento embrionário. A suplementação com antioxidantes intracelulares ou extracelulares durante as primeiras 72 horas de CIV não afetou as taxas de desenvolvimento embrionário até a fase de blastocistos, as taxas de re-expansão embrionária pós-vitrificação, bem como os níveis intracelulares de ROS.

## Referências

- ALI, A.A.; BILODEAU, J.F.; SIRARD, M.A. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. **Theriogenology.**, v.59, p.939-949, 2003.
- ARIAS, M.E.; SANCHEZ, R; FELMER, R. Evaluation of different culture systems with low oxygen tension on the development, quality and oxidative stress-related genes of bovine embryos produced *in vitro*. **Zygote**, p.1-9, doi:10.1017/S0967199411000025, Published in March of 2011.
- BAIN, N.T.; MADAN, P.; BETTS, D.H. The early embryo to intracellular reactive oxygen species is developmentally regulated. **Reprod. Fert. and Develop**, v.23, p.561-575, 2011.
- BAVISTER, B.D. Culture of preimplantation embryos: facts and artefacts. **Hum. Reprod.**, v.1, p.91-148, 1995.
- BETTS, D.H.; MADAN, P. Permanent embryo arrest: molecular and cellular concepts. **Mol. Hum. Reprod.**, v.14, p. 445- 453, 2008.
- CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; VAN LANGENDONCKT, A; MERMILLOD, P. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization *in vitro*. **Theriogenology.**, v.43; p.1115-1128, 1995.
- CAAMAÑO, J.N.; RYOO, Z.Y.; THOMAS, J.A.; YOUNGS, C.R.  $\beta$ -Mercaptoethanol enhances blastocysts formation rate of bovine *in vitro*-matured/*in vitro*-fertilized embryos. **Biol. Reprod.**, v.57, p.11791263, 1996.
- CORRÊA, G.A.; RUMPF, R.; MUNDIM, T.C.D.; FRANCO, M.M; DODE, M.A.N. Oxygen tension during *in vitro* culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. **Animal Reprod Scien.**, v.104, p.132-142, 2008.
- DALVIT, G.C; CETICA, P.D; PINTOS,L.N; BECONI, M.T. Reactive oxygen species in bovine embryo *in vitro* production. **Biocell.**, v.29, p.209-212, 2005.
- DELEUZE, S and GOUDET, G. Cysteamine supplementation of *in vitro* maturation media: a review. **Reprod. In Domest. Anim.**, v.45, p.476-482, 2010.
- DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C; MOSES, D.F.; MARTINEZ, A.G.; MATKOVIC, M. Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. **Mol. Reprod. Dev.**, v.45, p.451-458, 1996.

- DE MATOS, D.G; FURNUS, C.C. The importance of having high glutathione (GSH) levels after bovine *in vitro* maturation on embryo development: effect of  $\beta$ -mercaptoethanol, cysteine and cystine. **Theriogenology.**, v.53, p.761-842, 2000.
- DE MATOS, D.G; HERRERA, C.; CORTVRINDT, R.; SMITZ, J.; VAN SOOM, A; NOGUEIRA, D.; PASQUALINI, R.S. Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation and embryo culture: a useful tool for increasing the efficiency of bovine *in vitro* embryo production. **Mol. Reprod. And Develop.**, v.62, p.203-209, 2002.
- FEUGANG, J.M.; DE ROOVER, R.; MOEN, A.; LÉONARD, S.; DESSY, F.; DONNAY, I. Addition of beta-mercaptoethanol or Trolox at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidant agents. **Theriogenology.**, v. 61, p.71-90, 2004.
- FUGITANI, Y.; KASAI, K.; OHTANI, S.; NISHIMURA, K.; YAMADA, M.; UTSUMI, K. Effect of oxygen concentration and free radicals on *in vitro* development of *in vitro*-produced bovine embryos. **J. Anim. Sci.**, v.75, p.483-492, 1997.
- FUKUI, Y.; OYAMADA, T. Oxygen tension and medium supplements for *in vitro* maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined médium. **J. Reprod.**, v.50, n.1, p.107-117, 2004.
- GOTO, Y.; NODA, Y.; MORI, T.; NAKANO, M. Increased generation of reactive oxygen species in embryo cultured *in vitro*. **Free Rad.Biol.Med.**, v.15, p.69-75, 1993.
- GUÉRIN, P.; MOUATASSIM, S.EL.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reative oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update.**, v.7, p.175-189, 2001.
- HAMMOND, C.L.; LEE, T.K.; BALLATORI, N. Novel roles for glutathione in gene expression, cell death and membrane transport of organic solutes. **J. Hepatol.**; v.34, p.946-954, 2001.
- HARVEY, A.J. The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. **Anim. Reprod. Scien.**, v.98, p.113-128, 2007.
- HOSSEINI, S.M.; FOROUZANFAR, M.; HAJIAN, M.; ASGARI, V.; ABEDI, P.; HOSSEINI, L.; et al. Antioxidant supplementation of culture medium during embryo development and/or after vitrification-warming: which is the most important? **J. Assist. Reprod.**,v.26, p.355-364, 2009.
- IWATA, H.; AKAMATSU, S.; MINAMI, N.; YAMADA, M. Effects of antioxidants on the development of bovine IVM/IVF embryos in various concentrations of glucose. **Theriogenology.**, v.50, p.365-375, 1998.

- JOHNSON, M.H.; NARS-ESFAHANI, M.H. Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos *in vitro*? **Bioessays.**, v.16, p.31-39, 1994.
- KARJA, N.W.K.; KIBUCHI, K.; FAHRUDIN, M.; OZAWA, M.; SOMFAI, T.; OHNUMA, K.; NOGUCHI, J.; KANEKO, H.; NAGAI, T. Development to blastocyst stage, the oxidative state, and the quality of early development stage of porcine embryos cultured in alteration of glucose concentrations *in vitro* under different oxygen tensions. **Reprod. Biol. Endocrinology.**, v. 4, p.54, 2006.
- KHURANA N.K; NIEMANN, H. Effect of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrate on cleavage and morula/blastocysts formation of bovine embryos. **Theriogenology.**, v.54, p.741-756, 2000.
- KITAGAWA, Y.; SUZUKIB, K.; YONEDAA, A.; WATANABEA, T. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation on porcine embryos. **Theriogenology.**, v.62, p.1186-1283, 2004.
- KOURIDAKIS, K.; GARDNER, D.K. Pyruvate in embryo culture media acts as an antioxidant. **Proc. Fertile. Soc. Aus.**, v. 14, p.29, 1995.
- LEMINSKA, A.; WNUK, M.; SLOTA, E.; BARTOSZ, G. Total antioxidant capacity of cell culture media. **Clinical and Experim. Pharmac. and Physiology**, v.34, p.781-786, 2007.
- LIM, J.M.; LIOU, S.S.; HANSEL, W. Intracytoplasmatic glutathione concentration and the role of beta-mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryos. **Theriogenology.**, v.20, p.407-423, 1996.
- LIM, J.M.; REGGIO, B.C.; GODKE, R.A.; HANSEL, W. Development of *in vitro*-derived bovine embryos cultured in 5% de CO<sub>2</sub> in air ou in 5% O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub>. **Hum. Reprod.**, v.14, n.2, p.458-464, 1999.
- LONERGAN, P.; RIZOS,D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T; BOLAND, M.P. Oocytes and embryos quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reprod. Dom. Anim.**, v.38, p.259-167, 2003a.
- LOPES, A.S.; LANE, M.; THOMPSON, J.G. Oxygen consumption and ROS production are increased at the time of fertilization in cell cleavage in bovine zygotes. **Hum. Reprod.** ,v.25, p. 2763-2772, 2010.
- NARS-ESFAHANI, M.H.; AITKEN, J.R.; JOHNSON, M.H. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stages embryos developed *in vitro* or *in vivo*. **Development.**, v.109, p.501-508, 1990.

NEDAMBALE, T.; DU, F.; YANG, X.; TIAN, X. Higher survival rate of vitrified and thawed *in vitro* produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with beta-mercaptoethanol. **Anim. Reprod. Sci.**, v.93, p.61-75, 2006.

NODA, Y.; MATSUMOTO, H.; MAOKA, H.; TATSUMI, K.; KISHI, J.; MORI, T. Involvement of superoxide radicals in the mouse 2-cell block. **Mol. Reprod. Dev.**, v.28, p.356-260, 1991.

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

ORSI, N.M; LEESE, H.J. Protection against reactive oxygen species during mouse preimplantation embryo development: role of EDTA, oxygen tension, catalase, superoxide dismutase and pyruvate. **Mol. Reprod. Develop.**, v. 59, p.44-53, 2001.

PEREIRA, D.C; DODE, M.A.N.; RUMPF, M. Evaluation of different culture system on the *in vitro* production of bovine embryos. **Theriogenology.**, v.63, p.1131-1141, 2005.

RIZOS, D.; WARD, F.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. **Theriogenology.**, v.56, p.1-16, 2001.

SOMFAI, T; INABA, Y.; AIKAWA, Y; OHTAKE, M; KOBAYASHI, S.; KONISHI, K.; NAGAI, T.; IMAI, K. Development of bovine embryos cultured in CR1aa and IDV101media using different oxygen tension and culture systems. **Acta Veter. Hungárica.**, v.58,p. 465-474, 2010.

TAKAHASHI, M.; NAGAI, T.; HAMANO, S.; KUWAYAMA, M.; OKAMURA, N.; OKANO, A. Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos. **Biol. Reprod.** , v.49, p.228-264, 1993.

TAKAHASHI, M.; KEISHO, H.; TAKAHASHI, H., OGAWA, H.; SCHULTZ, R.M.; OKANO, A. Effect of oxidative stress on development and DNA damage in *in vitro*-cultured bovine embryos by cmet assay. **Theriogenology.**, v.54, p.137-145, 2000.

TAKAHASHI, M.; NAGAI, T.; OKAMURA, N.; TAKAHASHI, H.; OKANO, A. Promoting effect of beta-mercaptoethanol on *in vitro* development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos. **Biol. Reprod.**, v.66, p.562-569, 2002.

THOMPSON, J.G.E.; SIMPON. A.C.; PUGH, P.A; DONNELLY, P.E.; TERVIT, H.R. Effect of oxygen concentration on *in vitro* development of preimplantation sheep and cattje embryos. **J. Reprod. Fertil.**, v.89, p.573-578, 1990.

UFER, C.; WANG, C.C; BORCHERT, B.; HEYDECK, D.; KUHN, H. Redox control in mammalian embryo development. **Antioxidants & Redox Signaling.**, v.13; p.836-875, 2010.

VAN DER WESTERLAKEN L.A.J; VAN DER VLUGT J.J; DEWIT A.A.C; VAN DER SCHANS A. The effect of oxygen tension on *in vitro* fertilization and embryonic development. **Theriogenology.**, v 37, p.3-12, 1992.

VAN SOOM, A.; YUAN, Y.Q.; PEELMAN, L.J; DE MATOS, D.G; DEWULF,J.; LAEVENS,H.; DE KRUIF, A. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition. **Theriogenology.**, v.57, p.1453-1465, 2002.

VOELKEL, S.A.; HU, Y.V.; MOORE, K.; BONDIOLI, K.R. Freeze survival of bovine embryos produced by *in vitro* maturation, fertilization and culture of oocytes. **Theriogenology.**, v.37, p. 317 (abstr), 1992.

WRIGHT, J.M. Apêndice D. Ilustrações fotográficas do estágio de desenvolvimento embrionário e códigos de qualidade. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**, 4ª Edição, p. 165-168, 2009.

### **CAPÍTULO 3 - EFEITOS DE ANTIOXIDANTES NAS DIFERENTES ETAPAS DA PRODUÇÃO *IN VITRO* SOBRE O DESENVOLVIMENTO E CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS**

**RESUMO** – Embriões bovinos produzidos *in vitro* (PIV) são mais susceptíveis aos danos oxidativos, visto que seus mecanismos de defesa são insuficientes para proteger sua delicada estrutura celular. Logo, a suplementação *in vitro* com antioxidantes intra e extracelulares, nas diversas etapas da PIV, é de grande interesse para melhorar a qualidade, e conseqüentemente, a criotolerância embrionária. O estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito da suplementação com antioxidantes (0,6 mM cisteína – CIST; 100 UI catalase – CAT; e 100  $\mu$ M de  $\beta$ -mercaptoetanol –  $\beta$ -ME) nos meios de maturação *in vitro* (MIV) e/ou durante os 3 primeiros dias de cultivo *in vitro* (CIV) sobre o desenvolvimento, qualidade e criotolerância embrionários, bem como nos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (do inglês, ROS) produzidos durante o cultivo de embriões bovinos. Em relação aos diferentes antioxidantes e ao momento da suplementação (MIV e/ou CIV), não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) nas taxas de clivagem (80,0% a 82,91%; 80,0% a 82,48%, respectivamente), de desenvolvimento até a fase de blastocistos (40,51% a 56,44%; 41,73% a 55,40%, respectivamente), bem como no número total de blastômeros (85,59 a 90,55; 84,38 a 90,51, respectivamente) em relação ao Controle. Por outro lado, a suplementação com antioxidantes, seja na MIV, CIV ou ambos, promoveu redução na porcentagem de células apoptóticas e nos níveis intracelulares de ROS em relação ao Controle ( $P<0,05$ ), com a única exceção do grupo  $\beta$ -ME (0,88) que não diferiu estatisticamente ( $P>0,05$ ) do Controle (1,00). Após reaquecimento e cultivo *in vitro* por 24 horas, as taxas de re-expansão embrionária de todos os grupos não diferiram do Controle ( $P>0,05$ ). Porém, a suplementação com  $\beta$ -ME e CAT durante a MIV proporcionou maiores taxas de sobrevivência embrionária *in vitro* em relação à suplementação destes antioxidantes durante todo o processo de PIV ( $P<0,05$ ), indicando que a

suplementação durante o cultivo de maturação é mais benéfica do que quando realizado em outros momentos do cultivo. Desta forma, embora a suplementação com antioxidantes, independentemente do momento da PIV, tenha promovido redução nos níveis intracelulares de ROS e na porcentagem de apoptose nos embriões, não melhorou o desenvolvimento e criotolerância embrionária. Podemos concluir que a suplementação com antioxidantes foi uma estratégia interessante para melhorar a qualidade do embrião no que diz respeito à diminuição da morte celular ocasionada por estresse oxidativo, todavia esta melhoria não se refletiu em aumento da criotolerância embrionária.

**Palavras-Chave:** antioxidantes, apoptose, bovino, criopreservação, produção *in vitro*, ROS

## Introdução

O sistema de produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos é amplamente empregado para fins de pesquisa e comerciais, porém todas as etapas da PIV não se equiparam quando comparadas com a produção *in vivo* (MINGOTI *et al.*, 2011). Uma das razões que explicam este fato é que embriões PIV são mais susceptíveis aos danos oxidativos, visto que seus mecanismos de defesa são insuficientes para proteger sua delicada estrutura celular (AITKEN *et al.*, 1993). Tais danos são decorrentes da elevada produção de ROS nos sistemas de PIV de embriões, devido à ação de diversos fatores exógenos como a elevada tensão de oxigênio durante o CIV, presença de cátions metálicos na água e/ou reagentes utilizados, exposição à luz visível, produção de ROS pelos espermatozoides durante a fertilização *in vitro* (FIV) e o processo de criopreservação/reaquecimento (GUÉRIN *et al.*, 2001).

Embora prejudiciais quando em excesso, as ROS estão envolvidas em diversos processos fisiológicos relacionados com a atividade ovariana e gametogênese, incluindo a maturação oocitária, esteroidogênese e função do corpo lúteo (ISHIKAWA, 1993; SABATINI *et al.*, 1999; BEHRMAN *et al.*, 2001). Ainda, são elementos fundamentais nas vias da apoptose ou morte celular programada, sendo um mecanismo de extrema importância na eliminação de células inviáveis. Sabe-se que a presença de ROS durante a fertilização é necessária para otimizar a interação oócito-espermatozóide (WOLF, 2005) e o sucesso da fecundação (GONÇALVES, 2006). Todavia, a presença de ROS em excesso implica em diferentes tipos de injúrias celulares, incluindo peroxidação lipídica, oxidação de aminoácidos e ácidos nucléicos, necrose e apoptose, podendo ser correlacionado com o bloqueio do desenvolvimento embrionário com conseqüente diminuição da produtividade dos sistemas de PIV de embriões (ALI *et al.*, 2003; KITAGAWA *et al.*, 2004; GUÉRIN *et al.*, 2001). Desta forma, o equilíbrio das ROS é fundamental para proporcionar condições favoráveis de cultivo *in vitro*.

Para evitar danos induzidos pelo estresse oxidativo, vários antioxidantes intracelulares podem ser adicionados ao meio de cultura para melhorar o desenvolvimento com sucesso variável (GOTO *et al.*, 1993; NODA *et al.*, 1991). Compostos de tiol de baixo peso molecular, como  $\beta$ -mercaptoetanol, cisteína, cistina e cisteamina, são usados como suplementos do meio de maturação de oócitos (DE MATOS *et al.*, 1995; 1997) e de cultivo embrionário (CAAMAÑO *et al.*, 1996; LIM *et al.*, 1999; TAKAHASHI *et al.*, 1993).

Estes compostos são precursores para a síntese de glutathiona (GSH), que atua como principal sistema de defesa não enzimático em embriões. A GSH atua na manutenção do estado de redução-oxidação (redox) na célula protegendo-as contra os danos oxidativos (JOHNSON & NARS-ESFAHANI, 1994; DELEUZE & GOUDET, 2010). A GSH é sintetizada em oócitos e embriões bovinos a partir do estágio de 8-16 células, após a transição materno-zigótica (DE MATOS & FURNUS, 2000; TAKAHASHI *et al.*, 1993; LIM *et al.*, 1996; HAMMOND *et al.*, 2001). Ela é formada pelos aminoácidos glutamato, cisteína e glicina, sendo que sua síntese é limitada pela presença da L-cisteína no meio extracelular (DELEUZE & GOUDET, 2010). Ainda, a concentração de GSH em embriões está intimamente correlacionada com o desenvolvimento embrionário inicial e viabilidade após a criopreservação (GUÉRIN *et al.*, 2001).

Outra categoria de antioxidantes são os do tipo enzimáticos extracelulares, como a superóxido dismutase (SOD) e catalase (ORSI & LEESE, 2001). Estes podem ser utilizados para modulação das ROS extracelulares nos meios de cultivo *in vitro*, porém os relatos na literatura são muito controversos em relação aos efeitos destes antioxidantes na neutralização das ROS na PIV de embriões (ALI *et al.*, 2003).

IMAI *et al.* (2002) relataram que os embriões PIV são mais sensíveis às baixas temperaturas e possuem criotolerância inferior quando comparados àqueles obtidos em condição *in vivo*. Provavelmente esse fato é decorrente dos danos celulares e distúrbios metabólicos que os embriões sofrem no processo congelação-reaquecimento. O sucesso da criopreservação de embriões bovinos

PIV é fundamental para que se possa estabelecer sua utilização em escala comercial. Com os recentes avanços nos protocolos de congelação, a criopreservação de embriões PIV se tornou uma ferramenta rápida e confiável na que possibilitou o armazenamento por tempo indeterminado, de embriões com potencial de desenvolvimento *in vitro* superior (MORATÓ *et al.*, 2010). Todavia, pouca atenção tem sido dada ao possível efeito benéfico da adição de antioxidantes aos meios de maturação e cultivo embrionário *in vitro* sobre a criotolerância dos embriões bovinos (HOSSEINI *et al.*, 2009).

Desta forma, este estudo teve como objetivo principal avaliar o efeito de antioxidantes nas diferentes etapas da produção *in vitro*, sobre o desenvolvimento, qualidade e sucesso da criopreservação de embriões bovinos. Mais especificamente, avaliou-se: desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto; mensuração dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ROS:  $H_2O_2$ ,  $HO\cdot$ ,  $ROO\cdot$ ); proporção entre células viáveis e células em apoptose dos embriões, determinada pela coloração “in situ terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick and labeling assay” (TUNEL); taxas de re-expansão embrionária após o cultivo *in vitro* pós-descongelação.

## **Material e Métodos**

### **Reagentes químicos**

Os reagentes utilizados foram obtidos da empresa Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO), caso contrário encontram-se especificados. Todos os reagentes são testados para cultivo celular.

### **Obtenção e seleção de oócitos provenientes de ovários de abatedouro**

Ovários de bovinos abatidos nos frigoríficos da região de Araçatuba-SP foram retirados das carcaças, aproximadamente 20 minutos após o abate, mantidos em solução salina estéril a 30-35°C e transportados para o laboratório

em caixas térmicas, não excedendo o limite de 6 horas desde o abate até o início das aspirações. Folículos de 3 a 8 mm de diâmetro foram puncionados manualmente com auxílio de agulha de calibre 18 G adaptada a seringa de 10 mL, ambas descartáveis. Todo o material aspirado foi transferido para tubos plásticos de 50 mL, os quais permaneceram em repouso (decantação) por 15 minutos para posterior seleção dos complexos *cumulus*-oócitos (COCs). O sedimento foi transferido para placas de poliestireno de 60 mm de diâmetro e avaliado em microscópio estereoscópico. Os COCs circundados com pelo menos quatro camadas de células do *cumulus* compactas e com citoplasma contendo granulação homogênea foram selecionados para o cultivo de maturação.

#### **Maturação *in vitro* dos oócitos**

Os COCs selecionados foram lavados duas vezes em meio de lavagem H-199, constituído por TCM199 (Gibco BRL) suplementado com 0,2 mM de piruvato, 20 mM de HEPES, 5 mM de bicarbonato de sódio e 75 µg de gentamicina/mL. Posteriormente, foram lavados uma vez em meio de maturação B-199, constituído de TCM-199 suplementado com 0,2 mM de piruvato, 25 mM de bicarbonato de Sódio, 75 µg de gentamicina/mL, 0,5 µg de FSH/mL (Pluset®, Hertape Calier, Juatuba, MG, Brasil), 100 UI de hCG/mL (Vetecor®, Hertape Calier, Juatuba, MG, Brasil) e 10% de SFB (Gibco BRL), antes de serem transferidos para o cultivo de maturação.

Foram transferidos 50 COCs/poço da placa de cultivo (Costar® 3526, Corning Incorporated, NY, USA) contendo 500 µL de meio de maturação B-199 suplementado ou não com antioxidantes. Os COCs foram maturados por 22 horas em estufa a 38,5°C, 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar.

#### **Fertilização *in vitro***

Para os procedimentos de fertilização *in vitro* (FIV), foi utilizado o sêmen de um único touro Nelore da mesma partida. A palheta de sêmen foi descongelada à temperatura de 36°C por 40 segundos e o sedimento foi obtido por centrifugação

em gradiente de densidade descontínua de Percoll (250 µL de Percoll 45% sobre 250 µL de Percoll 90%, em microtubo de 1,5 mL; Pharmacia, Uppsala, Sweden), durante 7 minutos a 2500xg em temperatura ambiente. O sedimento recuperado foi avaliado quanto ao volume, concentração e motilidade espermática. A concentração final foi ajustada para  $25 \times 10^6$  de espermatozóides vivos por ml de meio fecundação (TALP-FIV) suplementado com 40 µL/mL solução de PHE (1 mM de hipotaurina, 2 mM de penicilamina e 250 mM de epinefrina) e 10 µg/mL de heparina. Aproximadamente  $100 \times 10^3$  espermatozóides foram adicionados a cada gota de 100 µL de meio TALP-FIV designado para cada grupo experimental. Os COCs foram lavados duas vezes em meio B-199 e uma vez em meio TALP-FIV. Foram adicionados 20 COCs por microgota de FIV, que foram co-incubados com os espermatozóides a 38,5°C, por 18-24 horas, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar.

#### **Cultivo embrionário *in vitro***

O cultivo de desenvolvimento foi realizado nas mesmas placas de poços utilizadas durante a MIV (Costar® 3526, Corning Incorporated, NY, USA). Foram transferidos 50 COCs/poço da placa de cultivo contendo 500 µL de meio "Synthetic Oviduct Fluid" (SOF) suplementado 0,2 mM de L-glutamina, 0,34 mM de citrato de sódio, 2,8 mM de myo-inositol, 2% de BEM aminoácidos essenciais, 1% de MEM aminoácidos não essenciais, 0,5% de BSA e 2,5% de SFB, suplementado ou não com os mesmos antioxidantes utilizados durante a MIV. O CIV foi conduzido em incubadora com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar, em temperatura de 38,5°C e umidade de 100% por 7 dias (168 hpi). Durante as primeiras 72 horas de CIV, o meio SOF foi suplementado ou não com os mesmos antioxidantes utilizados no cultivo de maturação.

Após 72 horas do cultivo, o meio de cultivo foi totalmente renovado por meio SOF sem a suplementação com antioxidantes. A clivagem foi avaliada 72 horas pós-inseminação (D3), e o desenvolvimento embrionário avaliado às 168 hpi (D7).

### **Vitrificação e Reaquecimento dos embriões**

Os procedimentos utilizados para vitrificação e reaquecimento foram realizados de acordo com o protocolo Vitri-Ingá® (Ingámed, Paraná, Brasil), sendo que os meios foram adquiridos desta empresa.

Os blastocistos expandidos obtidos no dia 7 do CIV de grau 1 e 2, classificados de acordo com o Manual da IETS (WRIGHT, 2009), foram selecionados para vitrificação. Os embriões foram lavados duas vezes em solução de manutenção sem crioprotetores (“Holding”) antes de serem transferidos para a solução VI-I de vitrificação, durante 5 minutos a 37°C. Posteriormente, foram transferidos para solução VI-II, durante 60 segundos em temperatura ambiente. Os embriões foram então depositados na porção final da haste de vitrificação com o mínimo volume de meio. Os protetores das hastes foram colocados horizontalmente no vapor de nitrogênio (N<sub>2</sub>) líquido por alguns minutos antes de iniciar o procedimento, para então serem mergulhados verticalmente de modo a ficarem totalmente submersos. Finalmente, as hastes contendo os embriões foram introduzidas no protetor, sendo então armazenadas em botijões criogênicos até o momento do uso nas etapas posteriores.

Para reaquecimento dos embriões, as hastes foram retiradas do N<sub>2</sub> e a extremidade contendo os embriões foi imersa em solução DV-I de desvitrificação durante 1 minuto, a 37°C, até que a microgota fosse desfeita. Em seguida, os embriões foram transferidos para a solução DV-II por 3 minutos em temperatura ambiente e, finalmente, para a solução DV-III por 10 minutos em temperatura ambiente. Por fim, foram lavados duas vezes em solução de lavagem em temperatura ambiente e cultivados em meio SOFaa por 24 horas em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. Ao final do período, foram avaliadas as taxas de re-expansão embrionária (sobrevivência *in vitro*).

### **Mensuração do conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelo ensaio com diclorofluoresceína**

Os níveis intracelulares de ROS ( $H_2O_2$ ,  $HO\cdot$ ,  $ROO\cdot$ ) foram quantificados através da utilização da sonda fluorescente diacetato de 6-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína ( $H_2DCFDA$ ; Molecular Probes, Invitrogen, Oregon, USA) de acordo com BAIN et al (2011). Resumidamente, os embriões foram lavados duas vezes em PBS e incubados em  $5\ \mu M$  de  $H_2DCFDA$  durante 30 minutos no escuro, a  $38,5^\circ C$  e 5%  $CO_2$  em ar. Posteriormente, foram lavados duas vezes em PBS. Os embriões corados foram avaliados imediatamente em microscópio invertido de epifluorescência (Olympus, IX51), sob excitação de 495 nm e emissão de 520 nm, e analisados pelo programa Q-Capture Pro Image software (Media Cybernetics, Inc., Version 5.0.1.26). Os valores da intensidade do sinal de fluorescência obtidos dos embriões analisados foram subtraídos da média dos valores do “background” obtidos nas imagens.

#### **Coloração “Terminal Transferase Assay” - TUNEL**

As células em apoptose dos embriões foram marcadas pela coloração “*in situ terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick and labeling assay*” (TUNEL), descrita por PAULA-LOPES e HANSEN (2002). Blastocistos obtidos no D7 foram lavados por quatro vezes em  $100\ \mu L$  de PBS 1% PVP (PBS-PVP) e posteriormente fixados, com a zona pelúcida intacta, em  $100\ \mu L$  de solução de paraformaldeído (4%), a temperatura ambiente por 1 hora. Os embriões foram permeabilizados em solução de Triton X-100 (0,5%, v/v) em citrato de sódio (0,1%), por 30 minutos em temperatura ambiente.

Os embriões reservados para o controle positivo foram incubados com DNase I ( $50\ UI/mL$  de água Milli-Q) (RNase free) a  $37^\circ C$  por 1 hora, enquanto que os embriões dos tratamentos permaneceram, pelo mesmo período, em gotas de  $100\ \mu l$  de PBS-PVP. Posteriormente, todos os embriões foram lavados em PBS-PVP e incubados, em câmara úmida, com  $15\ \mu L$  da mistura (1:9, da enzima – tubo 1 e do tampão da enzima – tubo 2, respectivamente) para a coloração de TUNEL (In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche Applied Science, IN, USA), por 1 hora a  $37^\circ C$  no escuro. Os embriões reservados para o controle negativo

foram incubados na ausência da enzima “terminal deoxynucleotidyl transferase” (TdT) (tubo 1, contida no kit). Posteriormente, os embriões foram incubados em solução Hoechst 33342 (1 µg/mL de PBS-PVP) por 30 minutos, em temperatura ambiente.

Por fim, os embriões foram lavados em PBS-PVP e colocados entre lâmina e lamínula com glicerina tamponada (9:1). Posteriormente, foram avaliados em microscópio equipado com epifluorescência (Olympus, IX51), excitação de 510-550 nm e emissão de 590 nm, quanto ao número de células com fragmentação de DNA (TUNEL positivas = fluorescência verde ou amarelada pontual dentro no núcleo) em relação ao número total de células (determinado pelos núcleos corados em azul pelo corante Hoechst).

### **Delineamento experimental**

Neste estudo foram avaliados os efeitos da suplementação com antioxidantes nos meios MIV e/ou CIV durante as primeiras 72 hpi (D3). As 168 hpi (D7) blastocistos expandidos graus I e II foram destinados à vitrificação e blastocistos e blastocistos iniciais foram destinados à coloração de ROS ou TUNEL.

Um total de 1863 COCs foram MIV durante 22 horas em meio B-199, sem suplementação com antioxidantes (Controle) ou suplementado com 0,6 mM de cisteína (CIST; ALI *et al.*, 2003), ou 100 µM de β-mercaptoetanol (β-ME; HOSSEINI *et al.*, 2009), ou 100 UI de catalase (CAT; ORSI & LEESE, 2001).

Após a FIV, os zigotos foram cultivados em meio SOF suplementado com ou sem os mesmos antioxidantes utilizados durante a MIV, nas primeiras 72 horas de CIV. Posteriormente, todos os grupos foram cultivados em meio SOF sem adição de antioxidantes.

Desta maneira, o estudo obedeceu a um esquema fatorial 3x3 (3 tratamentos - antioxidantes e 3 momentos - MIV e/ou CIV) mais um grupo testemunha adicional (Controle), num total de 10 grupos experimentais (Figura 1).

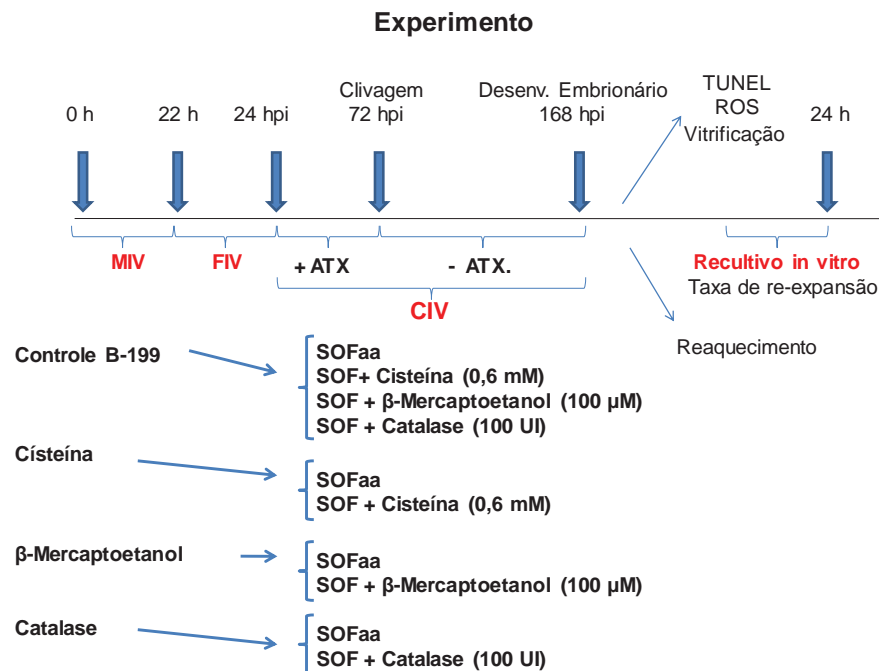


Figura 1. Atividades desenvolvidas no Experimento.

### Análise Estatística

Cada experimento foi repetido no mínimo 5 vezes para cada avaliação proposta, em replicatas independentes. Em cada replicata, foi utilizado um poço da placa de cultivo celular com 50 oócitos para cada grupo experimental, sendo que o poço foi considerado a unidade experimental.

Os dados foram analisados pela fração de embriões cultivados atingindo os estádios determinados, reportada em termos de porcentagem. As porcentagens foram transformadas utilizando arco seno raiz quadrada e os dados transformados foram analisados por PROC-GLM, considerando um modelo estatístico que inclui o tratamento (suplemento do meio de cultivo), o momento (MIV ou CIV) e possíveis interações. Para comparações entre grupos, a análise de variância foi utilizada nas variáveis contínuas. O estudo comparativo entre variáveis binomiais foi avaliado pelo teste do Qui-quadrado. Diferenças com probabilidades (P) menores que 0,05 foram consideradas significativas.

As análises foram realizadas pelo programa SAS (Statistical Analysis System) V.8.

## Resultados

Os valores das taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário até a fase de blastocistos para os diferentes tratamentos estão representados na Tabela 1. Como não houve interação ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos (controle, cisteína, catalase e  $\beta$ -mercaptoetanol) e o momento da suplementação com os diferentes antioxidantes (MIV, CIV ou MIV/CIV), os resultados se encontram apresentados separadamente, como variáveis independentes.

**Tabela 1.** Médias (quadrados mínimos  $\pm$  EPM) das taxas (%) de clivagem e desenvolvimento de embriões bovinos produzidos a partir de oócitos cultivados com diferentes antioxidantes durante a maturação e/ou cultivo *in vitro*.

Antioxidante	MIV	CIV	Nº oócitos	Clivagem (%média $\pm$ EPM)	Blastocistos (168 hpi) (%média $\pm$ EPM)
Controle	-	-	201	82,9% $\pm$ 3,2	48,7% $\pm$ 3,4
$\beta$ -ME	+	-	158	82,4% $\pm$ 5,2	51,4% $\pm$ 11,4
CIST	+	-	197	78,4% $\pm$ 2,1	53,9% $\pm$ 6,0
CAT	+	-	210	79,5% $\pm$ 3,5	59,7% $\pm$ 2,3
$\beta$ -ME	-	+	163	79,6% $\pm$ 3,0	33,4% $\pm$ 9,3
CIST	-	+	169	80,5% $\pm$ 3,1	37,1% $\pm$ 3,2
CAT	-	+	200	83,6% $\pm$ 3,7	53,0% $\pm$ 7,1
$\beta$ -ME	+	+	153	87,0% $\pm$ 1,8	36,0% $\pm$ 5,6
CIST	+	+	209	80,4% $\pm$ 2,5	34,4% $\pm$ 4,2
CAT	+	+	203	81,2% $\pm$ 3,0	56,8% $\pm$ 7,5
Total	-	-	1863	81,6%	46,4%

Taxa de clivagem e desenvolvimento de embriões cultivados em meios suplementados com diferentes antioxidantes durante a maturação e/ou durante as primeiras 72 horas pós-fertilização. Controle = sem suplementação com antioxidantes; CIST = cisteína;  $\beta$ -ME =  $\beta$ -mercaptoetanol; CAT = catalase; MIV = maturação *in vitro*; CIV = cultivo *in vitro*. Não houve interação entre o tratamento (antioxidantes) e o momento da suplementação (MIV e/ou CIV).

Quando foi avaliado o efeito da suplementação com diferentes antioxidantes, não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre a taxa de clivagem

e de blastocistos em relação ao Controle (Tabela 2). No entanto, o desenvolvimento embrionário até a fase de blastocistos foi superior no grupo CAT (56,44%) em relação aos grupos CIST (41,39%) e  $\beta$ -ME (40,51%) na produção de blastocistos ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 2.** Efeitos da suplementação com diferentes antioxidantes durante a produção *in vitro* de embriões bovinos sobre as taxas (%) de clivagem e desenvolvimento até a fase de blastocistos (médias dos quadrados mínimos  $\pm$  EPM).

Antioxidante	Nº Oócitos	Clivagem (% média $\pm$ EPM)	Blastocistos (168 hpi) (% média $\pm$ EPM)
Controle	201	82,1% $\pm$ 3,2 <sup>a</sup>	48,8% $\pm$ 3,4 <sup>ab</sup>
$\beta$ -ME	474	82,9% $\pm$ 2,1 <sup>a</sup>	40,5% $\pm$ 5,3 <sup>b</sup>
CIST	575	80,0% $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>	41,4% $\pm$ 3,5 <sup>b</sup>
CAT	613	81,4% $\pm$ 1,9 <sup>a</sup>	56,4% $\pm$ 3,3 <sup>a</sup>
Total	1863	81,6%	46,9%

Taxa de clivagem e desenvolvimento de embriões cultivados em meios suplementados com diferentes antioxidantes durante a maturação e/ou durante as primeiras 72 horas pós-fertilização. Controle = sem suplementação com antioxidantes, CIST = cisteína;  $\beta$ -ME =  $\beta$ -mercaptoetanol; CAT = catalase. Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre a taxa de clivagem e de desenvolvimento embrionário até blastocistos após suplementação com antioxidantes em diferentes momentos da produção *in vitro* (Tabela 3).

**Tabela 3.** Efeitos do momento (MIV e/ou CIV) da suplementação com diferentes antioxidantes durante a produção *in vitro* de embriões bovinos sobre as taxas (%) de clivagem e desenvolvimento até a fase de blastocistos (médias dos quadrados mínimos  $\pm$  EPM).

Momento	Nº Oócitos	Clivagem (% média $\pm$ EPM)	Blastocistos (168 hpi) (% média $\pm$ EPM)
Controle	201	82,1% $\pm$ 3,2 <sup>a</sup>	48,8% $\pm$ 3,4 <sup>a</sup>
MIV	565	80,0% $\pm$ 2,0 <sup>a</sup>	55,4% $\pm$ 3,7 <sup>a</sup>
CIV	532	81,6% $\pm$ 1,8 <sup>a</sup>	41,7% $\pm$ 4,5 <sup>a</sup>
MIV/CIV	565	82,5% $\pm$ 1,6 <sup>a</sup>	42,6% $\pm$ 4,3 <sup>a</sup>
Total	1863	81,5%	47,2%

Taxa de clivagem e desenvolvimento de embriões cultivados em meios suplementados com diferentes antioxidantes durante a maturação e/ou durante as primeiras 72 horas pós-fertilização. MIV = maturação *in vitro*; CIV = cultivo *in vitro*. Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Os níveis intracelulares de ROS foram quantificados e estão expressos na forma de unidades arbitrárias de fluorescência emitida pela coloração com o

fluorocromo H<sub>2</sub>DCFDA (Tabela 4). A análise demonstrou haver interação ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos (controle, cisteína,  $\beta$ -mercaptoetanol e catalase) e o momento da suplementação (MIV, CIV e MIV/CIV). Com a única exceção dos embriões cultivados *in vitro* com  $\beta$ -ME (0,88), os níveis intracelulares de ROS emitidos por embriões de todos os outros grupos foram inferiores ( $P > 0,05$ ) quando comparados com o controle (1,00).

**Tabela 4.** Níveis intracelulares de ROS em blastocistos bovinos produzidos *in vitro* a partir de oócitos cultivados com diferentes antioxidantes durante a maturação e/ou cultivo *in vitro*.

Antioxidante	MIV	CIV	Nº embriões avaliados	Unidades de fluorescência arbitrárias (Média $\pm$ EPM)
Controle	-	-	18	1,00 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>
$\beta$ -ME	+	-	9	0,70 $\pm$ 0,06 <sup>bc</sup>
CIST	+	-	10	0,78 $\pm$ 0,05 <sup>bc</sup>
CAT	+	-	9	0,65 $\pm$ 0,06 <sup>bc</sup>
$\beta$ -ME	-	+	10	0,88 $\pm$ 0,05 <sup>ab</sup>
CIST	-	+	9	0,60 $\pm$ 0,06 <sup>c</sup>
CAT	-	+	8	0,69 $\pm$ 0,06 <sup>bc</sup>
$\beta$ -ME	+	+	11	0,62 $\pm$ 0,05 <sup>c</sup>
CIST	+	+	11	0,77 $\pm$ 0,05 <sup>bc</sup>
CAT	+	+	6	0,69 $\pm$ 0,07 <sup>bc</sup>
Total	-	-	92	-

Mensuração de ROS (espécies reativas de oxigênio) em unidades de fluorescência arbitrárias pela coloração H<sub>2</sub>DCFDA de embriões PIV em meios suplementados ou não com antioxidantes. Controle = sem suplementação com antioxidantes, CIST = cisteína;  $\beta$ -ME =  $\beta$ -mercaptoetanol; CAT = catalase; MIV = maturação *in vitro*; CIV = cultivo *in vitro*.

Houve interação entre as variáveis antioxidantes e MIV e/ou CIV ( $P < 0,05$ ).

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Com relação ao número total de células (blastômeros) e taxa de células apoptóticas, não houve interação ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos e momento da suplementação. Desta forma, os resultados se encontram apresentados separadamente, como variáveis independentes (Tabelas 5 e 6). Quando foi

avaliado o efeito da suplementação com diferentes antioxidantes, não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) na contagem de células totais entre os grupos avaliados. Porém, a porcentagem de células apoptóticas foi inferior em todos os grupos quando comparados com o Controle ( $P < 0,05$ ), conforme demonstrado na Tabela 5.

**Tabela 5.** Efeitos da suplementação com diferentes antioxidantes durante a produção *in vitro* sobre o número total de células e taxa (%) de apoptose em blastocistos bovinos.

Antioxidantes	Nº embriões avaliados	Nº Total de células (Média $\pm$ EPM)	Células apoptóticas (% média $\pm$ EPM)
Controle	13	85,7 $\pm$ 3,5 <sup>a</sup>	4,3 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>
$\beta$ -ME	45	90,5 $\pm$ 2,6 <sup>a</sup>	1,4 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>
CIST	72	86,9 $\pm$ 2,6 <sup>a</sup>	1,9 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>
CAT	51	86,2 $\pm$ 2,3 <sup>a</sup>	2,0 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>
Total	181	-	-

Porcentagem de células em apoptose verificadas pela técnica do TUNEL de embriões produzidos *in vitro* a partir de oócitos bovinos MIV e/ou CIV com diferentes suplementos de antioxidantes. Controle = sem suplementação com antioxidantes, CIST = cisteína;  $\beta$ -ME =  $\beta$ -mercaptoetanol; CAT = catalase.

A porcentagem de células apoptóticas foi calculada sobre o número de células totais.

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Quando foi avaliado o efeito do momento da suplementação com antioxidantes, não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) na contagem de células totais entre os grupos avaliados. Porém, a porcentagem de células apoptóticas foi inferior em todos os grupos quando comparados com o Controle ( $P < 0,05$ ), conforme demonstrado na Tabela 6.

**Tabela 6.** Efeitos do momento (MIV e/ou CIV) da suplementação com diferentes antioxidantes durante a produção *in vitro* sobre o número total de células e taxa (%) de apoptose em blastocistos bovinos.

Antioxidantes	Nº embriões avaliados	Nº Total de células (Média ± EPM)	Células apoptóticas (% média ± EPM)
Controle	13	85,7 ± 3,5 <sup>a</sup>	4,3 ± 1,2 <sup>a</sup>
MIV	64	88,3 ± 2,1 <sup>a</sup>	1,7 ± 0,2 <sup>b</sup>
CIV	55	84,4 ± 2,4 <sup>a</sup>	2,0 ± 0,3 <sup>b</sup>
MIV/CIV	49	90,5 ± 3,0 <sup>a</sup>	1,8 ± 0,3 <sup>b</sup>
Total	181	-	-

Porcentagem de células em apoptose verificadas pela técnica do TUNEL de blastocistos produzidos *in vitro* em relação aos diferentes momentos de cultivo. MIV = maturação *in vitro*; CIV = cultivo *in vitro*.

A porcentagem de células apoptóticas foi calculada sobre o número de células totais.

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Em relação à taxa de re-expansão após reaquecimento e cultivo *in vitro* por 24 horas, não houve diferença significativa entre os tratamentos e o controle (P>0,05). Porém, a suplementação com  $\beta$ -ME e CAT durante a MIV proporcionou maiores taxas de sobrevivência embrionária *in vitro* em relação à suplementação com estes antioxidantes durante todo o processo de PIV (P<0,05). Os resultados estão demonstrados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Sobrevivência pós-desvitrificação de embriões produzidos a partir de oócitos cultivados com antioxidantes durante a maturação ou cultivo *in vitro*.

Antioxidante	MIV	CIV	Nºembriões vitrificados	Re-expansão 24 h N (%)
Controle	-	-	25	19 (76,00%) <sup>ab</sup>
β-ME	+	-	15	14 (93,33%) <sup>a</sup>
	-	+	15	11 (73,33%) <sup>ab</sup>
	+	+	16	8 (50,00%) <sup>b</sup>
CIST	+	-	26	20 (76,92%) <sup>ab</sup>
	-	+	38	27 (71,01%) <sup>ab</sup>
	+	+	30	20 (66,66%) <sup>b</sup>
CAT	+	-	26	23 (88,46%) <sup>a</sup>
	-	+	73	61 (83,56%) <sup>a</sup>
	+	+	62	41 (66,13%) <sup>b</sup>
Total	-	-	326	244

Taxa de re-expansão de blastocistos expandidos desvitrificados e cultivados *in vitro* em meio SOF, por 24 horas, obtidos de oócitos bovinos MIV e/ou CIV em meios suplementados com diferentes antioxidantes. Controle = sem suplementação com antioxidantes, CIST = cisteína; β-ME = β-mercaptoetanol; CAT = catalase; MIV = maturação *in vitro*; CIV = cultivo *in vitro*.

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado (P<0,05).

## Discussão

A GSH atua como o principal antioxidante não enzimático na eliminação das ROS e na manutenção do estado redox em oócitos e embriões (DE MATOS *et al.*, 1996; VIET LINH *et al.*, 2009; WOLF, 2005). O aumento durante a maturação parece estar correlacionado com a competência do oócito para o posterior desenvolvimento embrionário, uma vez que atua na proteção contra os danos decorrentes da ação das ROS até a ativação do genoma embrionário e início da síntese *de novo* de GSH (AVELINO, 2004; DELEUZE & GOUDET, 2010). Ainda, a concentração de GSH em embriões está intimamente correlacionada com o desenvolvimento inicial e viabilidade após a criopreservação (GUÉRIN *et al.*, 2001). Logo, a suplementação com antioxidantes nas diferentes etapas da PIV de embriões bovinos pode incrementar a qualidade e, conseqüentemente, a criotolerância embrionária.

Nesse estudo, o efeito da suplementação com antioxidantes, sobre as taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário foram modestas, diferindo de relatos encontrados na literatura (DE MATOS *et al.*, 2002; ALI *et al.*, 2003). Curiosamente, observou-se que a suplementação com catalase foi superior à suplementação com  $\beta$ -mercaptoetanol ou cisteína, demonstrando que a proteção extracelular talvez tenha sido mais importante nas condições estabelecidas no presente estudo. Ainda, MARTÍN-ROMERO (2008) demonstrou que o meio de cultivo pode ser a maior fonte de ROS durante o CIV. Ainda com relação a estes mesmos parâmetros, a suplementação com catalase demonstrou diferença consistente, embora não significativa, em relação ao controle. Outro fato observado em embriões deste grupo é que estes apresentaram melhor qualidade visual (de acordo com classificação proposta pelo Manual da IETS; WRIGHT, 2009) e sempre se encontravam em estágio de desenvolvimento mais avançados às 168 hpi, em comparação com os outros grupos (dados não demonstrados).

A catalase é um antioxidante enzimático extracelular que atua na modulação das ROS que são produzidas pelo próprio meio de cultura, porém os relatos na literatura são muito controversos em relação aos efeitos destes antioxidantes na neutralização das ROS na PIV de embriões (ALI *et al.*, 2003). Entretanto, com base nos nossos resultados, podemos especular que a catalase foi superior aos demais antioxidantes em decorrência da manutenção do equilíbrio redox dos embriões PIV e da eliminação dos  $H_2O_2$  produzidos no ambiente extracelular. Surpreendentemente, nesse estudo, a catalase demonstrou ser um potente antioxidante e que sua utilização pode melhorar a qualidade dos blastocistos produzidos e, conseqüentemente, aprimorar o sistema de PIV de embriões bovinos.

Os meios utilizados nos sistemas de produção *in vitro* de embriões foram suplementados com antioxidantes em diferentes etapas do cultivo (MIV, CIV ou MIV/CIV) visando definir o momento mais apropriado para inclusão destas substâncias. O desenvolvimento embrionário foi semelhante entre os diferentes momentos da suplementação.

Há vasta literatura disponível sobre os efeitos da inclusão de antioxidantes em sistemas de produção *in vitro* de embriões, todavia não há um consenso sobre qual o melhor tipo a ser utilizado, qual o momento ideal e qual concentração apropriada. Embora diversos relatos demonstrem benefícios após a inclusão de antioxidantes durante a maturação *in vitro* (TAKAHASHI *et al.*, 1993; DE MATOS *et al.*, 1996; DE MATOS & FURNUS, 2000; VAN SOOM *et al.*, 2002), outros trabalhos demonstram que a suplementação com antioxidantes durante a MIV não influencia nas taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário até a fase de blastocistos, apesar destes últimos relatarem aumento dos estoques intracelulares de GSH (DE MATOS *et al.*, 1995; ALI *et al.*, 2003; AVELINO, 2004; WOLF, 2005). O meio TCM 199, que é o mais frequentemente utilizado durante os procedimentos de cultivo de maturação *in vitro* pela maior parte dos laboratórios, possui em sua composição 0,6  $\mu\text{M}$  de cisteína e 83,2  $\mu\text{M}$  de cistina (0,0832 mM). No entanto, devido à auto-oxidação, a concentração da cisteína é significativamente diminuída após a preparação e equilíbrio do meio em incubadora (BANNAI, 1984; SAGARA *et al.*, 1993). O papel dos componentes de tiol de baixo peso molecular, como o  $\beta$ -mercaptoetanol e a cisteamina, é promover a redução de cistina em cisteína, disponibilizando-a para captação pelas células o que, conseqüentemente, estimula a síntese e aumenta a concentração intracelular de GSH (ISSELS *et al.*, 1988; TAKAHASHI *et al.*, 2002; DELEUZE & GOUDET, 2010).

Nossos resultados demonstraram que não houve efeito benéfico da adição de antioxidantes durante a MIV sobre a subsequente produção de embriões. Porém, de acordo com CETICA *et al.* (2001), a produção de ROS em níveis fisiológicos durante a MIV de oócitos bovinos pode melhorar a taxa de desenvolvimento embrionário visto que a adição de antioxidantes intracelulares pode tornar os oócitos menos competentes por inibirem o término da meiose. Logo, as ROS podem atuar como moléculas sinalizadoras na indução da maturação oocitária. De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, pode-se hipotetizar que a não inclusão de cisteína no meio de maturação pode ter

mascarado o efeito dos antioxidantes intracelulares durante a MIV, pois considerando-se a possibilidade de ter havido diminuição das concentrações de cisteína presente no meio TCM-199 devido a auto-oxidação, é possível que não tenha havido precursor suficiente para promover aumento nas concentrações de GSH no oócito.

A suplementação do meio de CIV ou MIV/CIV com antioxidantes não afetou as taxas de desenvolvimento embrionário até a fase de blastocistos. Da mesma forma como anteriormente citado para a suplementação do meio de MIV, a adição de antioxidantes durante o CIV, com intuito de combater os efeitos deletérios do estresse oxidativo, têm fornecido resultados muito contraditórios (NARS-ESFAHANI *et al.*, 1990; IWATA *et al.*, 1998; VAN SOOM *et al.*, 2002), demonstrando ausência de efeitos (NARS-ESFAHANI *et al.*, 1990; IWATA *et al.*, 1998), efeitos benéficos (DE MATOS *et al.*, 2002; ALI *et al.*, 2003; LIM *et al.*, 1996) ou ainda efeitos indesejáveis (VAN SOOM *et al.*, 2002). Parece que efeitos satisfatórios são observados apenas quando as condições do sistema de cultivo estabelecido são inadequadas (HARVEY *et al.*, 2007). O meio SOF, o qual foi utilizado no presente estudo, possui em sua composição 0,025 mM de cistina. Logo, a adição de precursores de GSH, como a cisteína ou cistina, associados ou não a componentes de tiol, parece ser uma estratégia interessante para aumentar a disponibilidade de cisteína para a célula e, conseqüentemente, aumentar os estoques intracelulares de GSH. Porém, no presente estudo não associamos o precursor a um componente de tiol e, provavelmente, em decorrência deste fato, não foi observado efeito da suplementação com antioxidantes. No entanto, como demonstrado em nossos resultados, o Controle do laboratório apresentou taxas de blastocistos superiores às encontradas em diversos relatos presentes na literatura (OLSON & SEIDEL, 2000; VAN SOOM *et al.*, 2002; ALI *et al.*, 2003), demonstrando que o sistema de PIV de embriões se apresentou adequado e satisfatório. Ainda, a composição dos meios, com a presença de SFB e BSA, a utilização de co-cultivo com células do *cumulus*, bem como as condições de

incubação estabelecidas (THOMPSON *et al.*, 1990) podem ter mascarado o potencial efeito dos antioxidantes.

A sonda fluorescente H<sub>2</sub>DCFDA é oxidada pelos radicais peróxidos de hidrogênio, seus derivados, outros peróxidos e indiretamente pelo ânion superóxido, proporcionando uma ferramenta confiável para avaliar a produção intracelular de ROS (DALVIT *et al.*, 2005). Nesse estudo, observou-se diminuição dos níveis intracelulares de ROS em blastocistos de todos os grupos experimentais, com exceção daqueles cultivados em meio suplementado com β-mercaptoetanol durante o CIV. Assim, a produção de embriões em meio suplementado com β-mercaptoetanol não alterou a quantidade e nem a qualidade dos embriões produzidos. Como discutido anteriormente, o mecanismo de ação deste tiol consiste na redução da cistina em cisteína, disponibilizando-a para aumentar a captação pelas células com consequente aumento nas concentrações de GSH. Porém, nas presentes condições, o efeito do β-mercaptoetanol pode ter sido mascarado devido a possível insuficiência de concentrações de precursores no meio de cultivo de desenvolvimento (FEUGANG *et al.*, 2004) ou mesmo devido às condições satisfatórias pré-existentes no sistema de cultivo estabelecido em nosso laboratório.

Por outro lado, a suplementação com antioxidantes intra e extracelulares, durante a PIV de embriões bovinos promoveu redução das ROS, provavelmente, pelo aumento dos estoques intracelulares de GSH ou pela remoção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido no meio extracelular, respectivamente. Já está bem elucidado, que a concentração de GSH depende da disponibilidade de cisteína para sua síntese e que a adição de componentes de tiol possibilitam sua captação (DELEUZE & GOUDET, 2010). Porém, os relatos na literatura são muito controversos em relação aos efeitos dos antioxidantes extracelulares, como a catalase, na neutralização das ROS na PIV de embriões (ALI *et al.*, 2003). Em suma, nesse estudo foi demonstrado o efeito da catalase na diminuição das ROS intracelulares de embriões bovinos PIV.

Nesse estudo, o número total de células embrionárias não diferiu entre os tratamentos, discordando de alguns relatos da literatura (CAAMAÑO *et al.*, 1996; VAN SOOM *et al.*, 2002; FEUGANG *et al.*, 2004). Porém, o status apoptótico foi reduzido, corroborando com alguns relatos da literatura (FERNANDES & COTTER, 1994; FEUGANG *et al.*, 2004), mas diferindo de outros (VAN SOOM *et al.*, 2002). É bem conhecido que a produção excessiva de ROS, decorrente de certas condições estabelecidas no CIV, pode levar à morte celular por apoptose, resultando em bloqueio do desenvolvimento embrionário (MATWEE *et al.*, 2000). A apoptose é considerada um fenômeno fisiológico que ocorre, por exemplo, durante a embriogênese, cuja finalidade é eliminar células inviáveis e lesadas que poderiam comprometer o desenvolvimento do embrião (FEUGANG *et al.*, 2004). Os resultados do presente estudo demonstraram claramente que a utilização de antioxidantes em sistemas de PIV melhorou a qualidade dos embriões bovinos no que diz respeito à sua capacidade de defesa contra o estresse oxidativo, visto que promoveu a diminuição dos níveis intracelulares de ROS e a redução da porcentagem de células apoptóticas. A relação direta entre estes fatores é claramente conhecida (VAN SOOM *et al.*, 2002), todavia, de acordo com nosso conhecimento, é a primeira vez que este efeito é demonstrado em sistema de PIV com a utilização da catalase. Em suma, a suplementação com antioxidantes, sejam estes intracelulares ou extracelulares, não promoveu aumento na taxa de produção *in vitro* de embriões bovinos, porém refletiu de maneira benéfica na sua qualidade.

O aumento na qualidade dos embriões, determinada neste estudo pela redução nos níveis intracelulares de ROS e do “status” apoptótico, contrariamente ao esperado, não refletiu em aumento na taxa de sobrevivência embrionária pós-vitrificação. Foi observado aumento numérico na sobrevivência de embriões dos grupos que receberam suplementação com  $\beta$ -mercaptoetanol e catalase durante a MIV, ou com catalase durante o CIV, todavia esta diferença não foi significativa. Provavelmente, o incremento nos parâmetros de qualidade observados neste estudo não foi suficiente para sobrepor vários outros fatores estressantes

envolvidos no processo de congelação/reaquecimento de embriões, principalmente o desencadeamento da peroxidação lipídica, ruptura da membrana plasmática e, na pior das situações, morte celular (KORHONEN *et al.*, 2012). Atualmente, vários estudos vêm sendo desenvolvidos visando a melhoria dos sistemas de criopreservação de embriões de mamíferos. Várias etapas dos processos celulares que ocorrem nesta situação específica ainda devem ser melhor compreendidas, pois somente este conhecimento pode levar à sua transposição. Assim, acredita-se que melhorias isoladas, como as aqui demonstradas, não sejam suficientes para promover o aumento expressivo nos índices de criopreservação. Todavia, cada incremento individual deve ser aplicado, levando-se em conta que a melhoria expressiva apenas será possível após a adoção de critérios globais, que atuem conjuntamente a favor da manutenção da viabilidade do embrião.

As taxas de sobrevivência *in vitro* de embriões cultivados com  $\beta$ -mercaptoetanol e catalase durante todo o período de PIV (MIV e CIV) foram inferiores em relação à suplementação com estes antioxidantes em momentos distintos, ou seja, somente na MIV ou no CIV. Conforme discutido anteriormente, pode-se supor que a suplementação prolongada com estes antioxidantes tenha interferido no equilíbrio redox. Consequentemente, a perturbação de diversos mecanismos fisiológicos de sinalização celular, dependentes de ROS, podem ter resultado na redução da taxa de re-expansão embrionária nos grupos citados. Por outro lado, um fato determinante a ser considerado é que, após a criopreservação, os embriões adquirem fragilidade estrutural por se tornarem extremamente vulneráveis aos danos decorrentes das ROS (NEDAMBALE *et al.*, 2006). Assim, mais uma vez parece ser essencial o estabelecimento de um equilíbrio entre produção e eliminação das ROS. A proteção contra os danos oxidativos parece ser uma estratégia interessante para melhorar a taxa de sobrevivência de embriões pós-reaquecimento, todavia, deve-se procurar estabelecer uma condição de equilíbrio entre produção e eliminação das ROS.

Em síntese, foi demonstrado no presente estudo que a adição dos antioxidantes intracelulares (cisteína ou  $\beta$ -mercaptoetanol) ou extracelular (catalase) durante a MIV e/ou até 72 hpi promoveu redução dos níveis intracelulares de ROS e da morte celular por apoptose em blastocistos bovinos, todavia não influenciou o desenvolvimento embrionário até a fase de blastocistos e nem a sobrevivência embrionária *in vitro* pós-reaquecimento.

### **Conclusão**

Pode-se concluir que a suplementação com antioxidantes é uma estratégia interessante para melhorar a qualidade do embrião no que diz respeito à diminuição da morte celular ocasionada por estresse oxidativo, todavia esta melhoria não se reflete em aumento da criotolerância embrionária.

## Referências

- AITKEN, R.J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potencial and human sperm function. **J. Reprod. Fertil.**, v.98, p.257-322, 1993.
- ALI, A.A.; BILODEAU, J.F.; SIRARD, M.A. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. **Theriogenology.**, v.59, p.939-949, 2003.
- AVELINO, K.B. **Efeitos da estimulação e inibição da síntese de glutathione durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos sobre o desenvolvimento e viabilidade embrionária.** 2004. 93f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal)-Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.
- BAIN, N.T.; MADAN, P.; BETTS, D.H. The early embryo to intracellular reactive oxygen species is developmentally regulated. **Reprod. Fert. and Develop**, v.23, p.561-575, 2011.
- BANNAI, S.; CHRISTENSEN, H. N.; VADGAMA, J. V.; ELLORY, J. C.; ENGLESBERG, E.; GUIDOTTI, G. G.; *et al.* Amino acid transport systems. **Nature.**, v.311, p.308, 1984.
- BERHMAN, H.R.; KODAMAN, P.H.; PRESTON, S.L.; GAO, S. Oxidative stress on the ovary. **J. Soc. Gynecol. Investig.**, v.8, p.40-42, 2001.
- CAAMAÑO, J.N.; RYOO, Z.Y.; THOMAS, J.A.; YOUNGS, C.R.  $\beta$ -Mercaptoethanol enhances blastocysts formation rate of bovine *in vitro*-matured/*in vitro*-fertilized embryos. **Biol. Reprod.**, v.57, p.11791263, 1996.
- CETICA, P.D.; PINTOS, L.N.; DALVIT, G.C.; BECONI, M.T. Antioxidant enzyme system and oxidative stress in bovine oocyte *in vitro* maturation. **IUMBMB Life.**, v.51, p.57-64, 2001.
- DALVIT, G.C; CETICA, P.D; PINTOS,L.N; BECONI, M.T. Reactive oxygen species in bovine embryo *in vitro* production. **Biocell.**, v.29, p.209-212, 2005.
- DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C; MOSES, D.F.; BALDASSARE, H. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocytes matured *in vitro*. **Mol. Reprod. Dev.**, v.42, p.432-438, 1995.
- DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C; MOSES, D.F.; MARTINEZ, A.G.; MATKOVIC, M. Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. **Mol. Reprod. Dev.**, v.45, p.451-458, 1996.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C; MOSES, D. F. Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. **Biol. Reprod.**, v.57, p.1420-1425, 1997.

DE MATOS, D.G; FURNUS, C.C. The importance of having high glutathione (GSH) levels after bovine *in vitro* maturation on embryo development: effect of  $\beta$ -mercaptoethanol, cysteine and cystine. **Theriogenology.**, v.53, p.761-842, 2000.

DE MATOS, D.G.; HERRERA, C.; CORTVRINDT, R.; SMITZ, J.; VAN SOON, A.; NOGUIERA, D. Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation and embryo culture: a useful tool for increasing the efficiency of bovine *in vitro* embryo production. **Mol.Reprod. Dev.**, v.62, p.203-202, 2002.

DELEUZE, S.; GOUDET, G. Cysteamine supplementation of of *in vitro* maturation media: a review. **Reprod. Dom. Anim.**, v.45, p.476-482, 2010.

FERNANDES, R.S.; COTTER, T.G. Apoptosis and necrosis: intracellular levels of GSH influence mode of cell death. **Biochem. Pharmacol.** v. 48, p.675-756, 1994.

FEUGANG, J.M.; DE ROOVER, R.; MOENS, A.; LÉONARD, S.; DESSY, F; DONNAY, I . Addition of  $\beta$ -Mercaptoethanol or Trolox at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidants agents. **Theriogenology.**, v.63, p.71-90, 2004.

GOTO, Y.; NODA, Y.; MORI, T.; NAKANO, M. Increased generation of reactive oxygen species in embryo cultured *in vitro*. **Free Rad.Biol.Med.**, v.15, p.69-75, 1993.

GONÇALVES, F.S. **Efeitos de antioxidantes adicionados ao meio de fecundação *in vitro* sobre a capacitação espermática e desenvolvimento embrionário em bovinos.** 2006. 117f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal)- Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

GUÉRIN, P.; MOUATASSIM, S.EL.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reative oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**, v.7, p.175-189, 2001.

HAMMOND, C.L.; LEE, T.K.; BALLATORI, N. Novel roles for glutathione in gene expression, cell death and membrane transport of organic solutes. **J. Hepatol.**; v.34, p.946-954, 2001.

HARVEY, A.J. The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. **Anim. Reprod. Scien.**, v.98, p.113-128, 2007.

HOSSEINI, S.M.; FOROUZANFAR, M.; HAJIAN, M.; ASGARI, V.; ABEDI, P.; HOSSEINI, L.; et al. Antioxidant supplementation of culture medium during embryo development and/or after vitrification-warming: which is the most important? **J. Assist. Reprod.**, v.26, p.355-364, 2009.

IMAI, K.; MATOBA, S.; DOCHI, O.; SHIMOHIRA, I. Different factors affect developmental competence and cryotolerance in *in vitro* produced bovine embryo. **Theriogenology**, v.64, n.10, p.887-891, 2002.

ISSELS, R.D.; NAGELE, A.; ECKERT, K.G.; WILMANN, W. Promotion of cystine uptake and its utilization for glutathione biosynthesis induced by cysteamine and N-acetyl-cysteine. **Biochemistry Pharmacology**, v.37, p.881-889, 1988.

ISHIKAWA, W. Oxygen radicals-superoxide dismutase system and reproduction medicine. **Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi**, v.45, p.842-848, 1993.

IWATA, H.; AKAMATSU, S.; MINAMI, N.; YAMADA, M. Effects of antioxidants on the development of bovine IVM/IVF embryos in various concentrations of glucose. **Theriogenology**, v.50, p.365-375, 1998.

JOHNSON, M.H.; NARS-ESFAHANI, M.H. Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos *in vitro*? **Bioessays**, v.16, p.31-39, 1994.

KITAGAWA, Y.; SUZUKI, K.; YONEDAA, A.; WATANABE, T. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation on porcine embryos. **Theriogenology**, v.62, p.1186-1283, 2004.

KORHONEN, K.; JULKUNEN, H.; KANANEN, K.; BREDBACKA, TIIRIKKA, T.; RÄTY, M.; VARTIA, K.; et al. Effect of ascorbic acid during biopsy and cryopreservation on viability of bovine embryos produced *in vivo*. **Theriogenology**, v.77, p.201-205, 2012.

LIM, J.M.; LIOU, S.S.; HANSEL, W. Intracytoplasmic glutathione concentration and the role of beta-mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryos. **Theriogenology**, v.20, p.407-423, 1996.

LIM, J.M.; REGGIO, B.C.; GODKE, R.A.; HANSEL, W. Development of *in vitro*-derived bovine embryos cultured in 5% de CO<sub>2</sub> in air ou in 5% O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub>. **Hum. Reprod.**, v.14, n.2, p.458-464, 1999.

MARTÍN-ROMERO, F.J. Contribution of culture media to oxidative stress and its effects on human oocytes. **Reproductive Biomedicine Online**, v.17, p.652-661, 2008.

MATWEE, C.; BETTS, D.H.; KING, W.A. Apoptosis in the early bovine embryos. **Zygote**, v.8, p.55-68, 2000.

MINGOTI, G.Z.; CAIADO CASTRO, V.S.D.; MÉO, S.C.; BARRETO, L.S.S.; GARCIA, J.M. The effect of interaction between macromolecule supplement and oxygen tension on bovine oocytes and embryos cultured *in vitro*. **Zygote**, v. 17, p.321-328, 2009.

MORATÓ, R.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, M.T.; MOGAS, T. Survival and apoptosis rates after vitrification in cryotop devices of *in vitro*-produced calf and cow blastocysts at different developmental stages. **Reprod. Fert. Develop.**, v.22, p.1141-1147, 2010.

NARS-ESFAHANI, M.H.; AITKEN, J.R.; JOHNSON, M.H. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stages embryos developed *in vitro* or *in vivo*. **Development**, v.109, p.501-508, 1990.

NEDAMBALE, T.; DU, F.; YANG, X.; TIAN, X. Higher survival rate of vitrified and thawed *in vitro* produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with beta-mercaptoethanol. **Anim. Reprod. Sci.**, v.93, p.61-75, 2006.

NODA, Y.; MATSUMOTO, H.; MAOKA, H.; TATSUMI, K.; KISHI, J.; MORI, T. Involvement of superoxide radicals in the mouse 2-cell block. **Mol. Reprod. Dev.**, v.28, p.356-260, 1991.

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

ORSI, N.M; and LEESE, H.J. Protection against reactive oxygen species during mouse preimplantation embryo development: role of EDTA, oxygen tension, catalase, superoxide dismutase and pyruvate. **Mol. Reprod. and Develop**, v.59, p.44-53, 2001.

PAULA-LOPES, F.F; HANSEN, P.J. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. **Biology of Reproduction**, v. 66, p.1169-77, 2002.

SABATINI, L.; WILSON, C.; LOWER, A.; et al. Superoxide dismutase activity in human follicular fluid after controlled ovarian hyperstimulation in women undergoing *in vitro* fertilization. **Fertil. Steril.**, v.72, p.1027-1034, 1999.

SAGARA, J.; MIURA, K.; BANNAI, S. Cystine uptake and glutathione level in fetal brain cells in primary culture and suspension. **J Neurochem.**, v.61, p.1667-1738, 1993.

TAKAHASHI, M.; NAGAI, T.; HAMANO, S.; KUWAYAMA, M.; OKAMURA, N.; OKANO, A. Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos. **Biol. Reprod.** , v.49, p.228-264, 1993.

TAKAHASHI, M.; NAGAI, T.; OKAMURA, N.; TAKAHASHI, H.; OKANO, A. Promoting effect of beta-mercaptoethanol on *in vitro* development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos. **Biol. Reprod.**, v.66, p.562-569, 2002.

THOMPSON, J.G.E.; SIMPON, A.C.; PUGH, P.A; DONNELLY, P.E.; TERVIT, H.R. Effect of oxygen concentration on *in vitro* development of preimplantation sheep and cattle embryos. **J. Reprod. Fertil.**, v.89, p.573-578, 1990.

VAN SOOM, A.; YUAN, Y.Q.; PEELMAN, L.J; DE MATOS, D.G; DEWULF, J.; LAEVENS, H.; DE KRUIF, A. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition. **Theriogenology**, v.57, p.1453-1465, 2002.

VIET LINH, N.; DANG-NGUYEN, T.Q.; NGUYEN, B.X.; MANABE, N.; NAGAI, T. Effects of cysteine during *in vitro* maturation of porcine oocytes under low oxygen tension on their subsequent *in vitro* fertilization and development. **J. Reprod. and Develop.**, v.55, p.594-598, 2009.

WOLF, A. **Estímulo da síntese de glutatona na maturação *in vitro* de oócitos bovinos e sua influência no desenvolvimento embrionário**. 2005. 101f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal)- Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

WRIGHT, J.M. Apêndice D. Ilustrações fotográficas do estágio de desenvolvimento embrionário e códigos de qualidade. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**, 4ª Edição, p. 165-168, 2009.