

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

**Antioxidantes na produção *in vitro* de embriões e
criopreservação de sêmen de ovinos**

Jorgea Pradieé

Pelotas, 2013

JORGEA PRADIEÉ

**Antioxidantes na produção *in vitro* de embriões e
criopreservação de sêmen de ovinos**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área do conhecimento: Reprodução Animal).

Orientador: Thomaz Lucia Jr.

Comitê de orientação: Lígia M. Cantarelli Pegoraro

Arnaldo Diniz Vieira

Rafael Gianella Mondadori

Pelotas, 2013

Dados de catalogação na fonte:

(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

P896a Pradiee, Jorgea

Antioxidantes na produção *in vitro* de embriões e criopreservação de sêmen de ovinos. / Jorgea Pradiee ; orientador Thomaz Lucia Jr. - Pelotas, 2013.-69f. : il.- Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Faculdade de Veterinária.

Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2013.

1.Cisteína 2.Espermatozoides 3.Oócito 4.β-mercaptoetanol. I.Lucia Jr., Thomaz(orientador) II .Título.

CDD 636.0824

Banca examinadora:

Prof. Dr. Thomaz Lucia Jr.

Profa. Dra. Mari Lourdes Bernardi

Profa. Dra. Carine Dahl Corcini

Prof. Dr. Gabriel Ribas Pereira

À Deus, força suprema que nos guia e nos permite o aperfeiçoamento moral;

Aos meus pais, Luciana e Jorge pelo incentivo e incondicional amor;

Ao meu grande amigo e amor Dirceu, como traduz Saint-Exupéry:

“Amar não é olhar um para o outro, mas olhar juntos na mesma direção”!

À minha família e aos amigos.

Pelo apoio, paciência, compreensão, encorajamento, carinho e amor...

Dedico.

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-graduação em Veterinária/ UFPEL, pela oportunidade de realizar o doutorado;

Ao meu orientador Thomaz Lucia Jr., por me aceitar e proporcionar o aperfeiçoamento dos conhecimentos científicos;

A EMBRAPA Clima Temperado, pelo consentimento da bolsa no primeiro ano do doutorado; pela oportunidade de aprendizado e execução dos trabalhos no Laboratório de Reprodução Animal;

A pesquisadora Dra. Lígia M. Cantarelli Pegoraro, por me ensinar, incentivar e por ter acreditado em mim como co-orientada.

Aos co-orientadores: Prof. Dr. Arnaldo Diniz Vieira e Prof. Dr. Rafael Gianela Mondadori, o meu especial agradecimento, vocês foram muito importantes na minha formação, desde a escrita dos projetos, execução dos trabalhos até a escrita final dos artigos.

Aos professores Ivan Bianchi, Carine Dahl Corcini, Carlos Eduardo da Rosa (Nino); aos funcionários, Sr. Paulo (UFPEL), D.Ledi (Embrapa) e Giovane (Embrapa) com os quais convivi durante estes quatro anos, pelo apoio prestado no decorrer do curso, e pela amizade.

Aos colegas e amigos do REPROPEL e Laboratório de Reprodução Animal da EMBRAPA: Liziane, Elisangela, Elisa, Alex, Gustavo, Raquel, Karina, Fabiana, Carlos, Zilah e Kauê; e também a todos os estagiários deste mesmo grupo, que foram muitos desde que entrei, mas especialmente aos que mais me acompanharam: Estela, Tainã, José César, Andressa, Bruna, Stela Mari, Anderson, Guilherme e Luzia, pela amizade, companheirismo e ajuda durante as fases de campo dos experimentos.

À minha família e a todos aqueles que, de alguma forma, auxiliaram na realização deste projeto, deixo meu agradecimento e o desejo de sucesso.

Muito obrigada!

Resumo

PRADIEE, Jorgea. **Antioxidantes na produção *in vitro* de embriões e criopreservação de sêmen de ovinos.** 2013. 69f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Na tentativa de diminuir os danos estruturais na membrana plasmática, devido aos radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS), os antioxidantes β -mercaptoetanol (BME) e cisteína (CIS) foram testados na criopreservação de sêmen e na maturação (MIV) e cultivo (CIV) *in vitro* de embriões de ovinos. Amostras de sêmen de quatro carneiros da raça Crioula Lanada foram coletadas com vagina artificial, duas vezes por semana ($n = 23$). As amostras dos quatro machos foram combinadas em *pool* e divididas em seis tratamentos: T1, Controle, sem antioxidante; T2, com 2mM BME; T3, com 5mM BME; T4, com 2mM BME e 5mM de cisteína; T5, com 5mM BME e 5mM de cisteína; e T6 com 5mM de cisteína. O sêmen foi diluído em tris-gema-glicerol e estocado em palhetas de 0,25 mL contendo 100×10^6 espermatozoides. O resfriamento e o congelamento foram realizados em máquina TK3000 e o descongelamento foi realizado a 37°C por 20 s. A motilidade, a integridade da membrana espermática e do acrossoma e a atividade mitocondrial, antes do congelamento e após o descongelamento, não diferiram entre os tratamentos ($P > 0,05$). A quantificação de ROS e da atividade antioxidante total pós-descongelamento foram semelhantes entre os tratamentos ($P > 0,05$). Nas concentrações testadas, a inclusão de BME e cisteína não influenciou a viabilidade espermática pós-descongelamento. No primeiro experimento de PIV, a inclusão de 20 μ M de BME na MIV e CIV de embriões foi comparada a um tratamento controle sem antioxidantes. Não houve efeito deletério do antioxidante sobre a taxa de clivagem (Controle: 70,0%; BME: 69,8%). Porém, a taxa de desenvolvimento até o estágio de blastocisto no tratamento BME (5,2%) foi inferior ($P < 0,001$) à do controle (16,9%). No segundo experimento, foi testada a associação de 50 μ M de BME e 600 μ M de CIS, na MIV e CIV. Não houve diferença entre os tratamentos controle e BME/CIS ($P > 0,05$), quanto às taxas de clivagem (60,3% e 64,3%, respectivamente) e de desenvolvimento embrionário (33,6% e 36,6%, respectivamente). A adição isolada de 20 μ M de BME na MIV e CIV de embriões ovinos foi associada com redução no desenvolvimento embrionário até blastocisto. Porém, a adição dos antioxidantes BME e cisteína, em associação, não afetou as taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário até blastocisto. Assim, a associação dos antioxidantes BME e CIS usados no congelamento de sêmen ovino e na PIV, não promoveu melhora dos tratamentos em que foram adicionados, ainda que em concentrações diferentes.

Palavras-chave: β -mercaptoetanol. Cisteína. Espermatozoides. Oócito.

Abstract

PRADIEE, Jorgea. **Antioxidantes na produção *in vitro* de embriões e criopreservação de sêmen de ovinos**. 2013. 69f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

In an attempt to diminish the structural damage to the plasma membrane, due to free radicals and reactive oxygen species (ROS), the antioxidants β -mercaptoethanol (BME) and cysteine (CIS) were tested for semen cryopreservation and *in vitro* maturation (IVM) and culture (IVC) of ovine embryos. Semen samples from four rams of the Crioula Lanada breed were collected with artificial vagina twice weekly (n = 23). Samples of four rams were pooled and split in six treatments: T1, control without antioxidant, T2, with 2mM BME, T3, with 5mM BME, T4, with 2mM BME and 5mM cysteine; T5, with 5 mM BME and 5mM cysteine, and T6 with 5 mM cysteine. Semen was diluted in tris-egg yolk-glycerol and stored in straws of 0.25 mL containing 100 x 10⁶ spermatozoa. Cooling and freezing were performed using a TK3000 and thawing was performed at 37°C for 20 s. Sperm motility, membrane integrity and mitochondrial activity and acrosome, before freezing and after thawing, did not differ between treatments (P > 0.05). Quantification of ROS and total antioxidant activity after thawing were similar between treatments (P > 0.05). At the tested concentrations, the inclusion of BME, and cysteine did not affect sperm viability after thawing. In the first experiment of IVP, the inclusion of 20 mM of BME in IVM and IVC of embryos was compared to a control treatment without antioxidants. There was no deleterious effect of antioxidant on the cleavage rate (control: 70.0%; BME: 69.8%). However, the rate of development to the blastocyst stage with BME (5.2%) was lower (P < 0.001) than with the control (16.9%). In the second experiment, we tested the association of 50 mM BME and 600 mM of CIS in IVM and IVC. There was no difference between control and BME/CIS (P > 0.05), for cleavage (60.3% and 64.3%, respectively) and embryonic development rates (33.6% and 36.6 %, respectively). The addition of 20 mM of isolated BME in IVM and IVC sheep embryos was associated with decreased embryonic development to blastocyst. However, the addition of antioxidants BME, and cysteine in combination, did not affect the rates of cleavage and embryo development to blastocyst. Therefore, the combination of antioxidants and CIS BME used in freezing ram semen and PIV, did not improve the treatments that have been added, albeit at different concentrations.

Keywords: β -mercaptoethanol. Cysteine. Spermatozoa. Oocyte.

Lista de Figuras

- FIGURA 1 Taxa de re-expansão (24 h) e eclosão (48 h) por tratamento, durante cultivo suplementar *in vitro* após reaquecimento de embriões vitrificados. Controle: sem antioxidantes. BME: inclusão de 20 μ M de BME nos meios de MIV e CIV.....57
- FIGURA 2 Taxa de re-expansão (24 h) e eclosão (48 h) por tratamento, durante cultivo suplementar *in vitro* após reaquecimento de embriões vitrificados. Controle: sem adição de antioxidantes. BME/CIS: inclusão de 50 μ M de BME e 600 μ M de CIS nos meios de MIV e CIV.....58

Lista de Tabelas

ARTIGO 1. Efeito antioxidante de β -mercaptoetanol e cisteína sobre a viabilidade pós-descongelamento de sêmen de ovinos da raça Crioula Lanada

- TABELA 1 Motilidade, integridade da membrana espermática (MEMB), do acrossoma (ACR) e atividade mitocondrial (MIT) de sêmen ovino antes e após descongelamento.....35
- TABELA 2 Motilidade espermática de sêmen ovino em dois períodos pós-descongelamento por tratamento.....36
- TABELA 3 Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e capacidade antioxidante total (TOSC) de sêmen ovino pós-descongelamento por tratamento.....37

ARTIGO 2. Efeito dos antioxidantes β -mercaptoetanol e cisteína sobre a maturação e cultivo *in vitro* de embriões ovinos

- TABELA 1 Taxas de clivagem, desenvolvimento embrionário até o oitavo dia após a inseminação (D8) e rendimento global de acordo com a inclusão de β -mercaptoetanol (20 μ M) nos meios de maturação e cultivo *in vitro*.....55
- TABELA 2 Taxas de clivagem, desenvolvimento até o sétimo dia após a inseminação (D7) e rendimento global de acordo com a inclusão de β -mercaptoetanol (50 μ M) e cisteína (600 μ M) nos meios de maturação e cultivo *in vitro*.....56

Sumário

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
3 ARTIGOS	15
3.1 Artigo 1. EFEITO ANTIOXIDANTE DE β -MERCAPTOETANOL E CISTEÍNA SOBRE A VIABILIDADE PÓS-DESCONGELAMENTO DE SÊMEN DE OVINOS DA RAÇA CRIOULA LANADA	15
Resumo	16
1.Introdução	17
2.Materiais e métodos	18
2.1 Processamento do sêmen e avaliações	19
2.2 Análises Bioquímicas	21
2.2.1 Espécies reativas de oxigênio (ROS)	21
2.2.2 Capacidade antioxidante total (TOSC)	22
4 Resultados	23
5Discussão	24
6 Conclusão	26
3.2 Artigo 2 EFEITO DOS ANTIOXIDANTES β -MERCAPTOETANOL E CISTEÍNA SOBRE A MATURAÇÃO E CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES OVINOS	38
Resumo	39
1 Introdução	39
2 Material e métodos	42
2.1 Primeiro experimento: BME na MIV e CIV de embriões ovinos	42
2.2 Segundo experimento: BME associado à CIS na MIV e CIV de embriões ovinos	44
2.3 Análise dos dados	44
3 Resultados	44

4 Discussão.....	45
5 Conclusões.....	47
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
5 REFERÊNCIAS GERAIS	61

1 INTRODUÇÃO

Estratégias da reprodução assistida que maximizem o potencial reprodutivo, como a criopreservação de sêmen, a produção *in vitro* de embriões (PIV) e a criopreservação de embriões tem apresentado crescimento substancial nos últimos anos (SALAMON & MAXWELL, 2000; MARTINÉZ et al., 2006; BUCAK et al., 2008; HOSSEINI et al., 2011; ROMÃO et al., 2013). Atualmente a PIV ovina vem sendo melhorada (COGNIÉ et al., 2003) e ganhando espaço no Brasil (FONSECA et al., 2010) já que permite que uma fêmea doe um maior número de oócitos desde antes da sua puberdade até a senilidade, e até mesmo num período recente após sua morte.

Outra biotécnica importante, podendo ser associada à PIV, é a criopreservação de oócitos, embriões e sêmen, permitindo a maximização da eficiência reprodutiva, além da preservação do material genético tanto de animais de alto valor quanto de animais em risco de extinção. Isto possibilitará, para os últimos, a formação de bancos de germoplasma, ou seja, promover a preservação *ex situ* de raças ovinas como a Crioula Lanada.

Entre os entraves que limitam a PIV de embriões ovinos, pode-se destacar, durante a fase de maturação *in vitro* (MIV), a maturação citoplasmática e nuclear do oócito. Portanto, é imprescindível que o oócito esteja maduro para que, na fase de fecundação *in vitro* (FIV), possa ser fecundado pelo espermatozoide. Outro fator importante é a contribuição do macho para a FIV, pois diferenças são encontradas na fertilidade entre indivíduos. Quanto ao desenvolvimento embrionário na etapa de cultivo *in vitro* (CIV), deve-se levar em consideração que a PIV, por ser um sistema fechado, não permite trocas das substâncias metabolizadas no meio, tornando-se saturado.

Assim, visando mimetizar os sistemas enzimáticos específicos que atuam *in vivo*, antioxidantes estão sendo cada vez mais utilizados na PIV na tentativa de

diminuir os danos causados às células (DE MATOS et al., 2002; BAI et al., 2008), sobretudo aos lipídeos da membrana plasmática, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, que alteram a estrutura, a integridade e fluidez das membranas biológicas (NIKI et al., 2009). A origem de tais injúrias se dá pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) que são produzidos principalmente pelas mitocôndrias (KOWALTOWSKI et al., 2009). Conforme já descrito em outras espécies, (FUNAHASHI et al., 2005; FURNUS et al., 2008) a adição dos antioxidantes β -mercaptoetanol (BME) e cisteína (CIS) (BAI et al., 2008) aos meios de maturação *in vitro* (MIV) e cultivo *in vitro* (CIV) seria uma alternativa para minimizar tais prejuízos.

A integridade de membranas biológicas pós-descongelamento é imprescindível para a funcionalidade dos espermatozoides criopreservados. Assim como observado na PIV, dentre os fatores que influenciam na qualidade espermática estão a formação de radicais livres e ROS que provocam a redução da motilidade espermática (BILODEAU et al., 2001), além de comprometer sua viabilidade devido a danos nas membranas e material genético (PERIS et al., 2007).

Diferentes antioxidantes, enzimáticos e não enzimáticos, como a catalase, análogos da vitamina E, glutathiona (GSH), CIS, entre outros, vêm sendo testados como aditivo no congelamento de sêmen ovino (BUCAK et al., 2008; MAIA et al., 2010; SICHERLE et al., 2011). Entretanto, os resultados obtidos não permitiram um incremento significativo na viabilidade espermática pós-congelamento. Esta resposta pode ter sido provocada pela rota de atuação dos antioxidantes utilizados, que não proporcionaram a adequada produção de antioxidantes intracelulares. Para obter tal resultado sugere-se a abordagem que visa disponibilizar precursores de GSH, que é o principal antioxidante intracelular (LUBERDA, 2005). Agentes derivados dos tióis, como o BME, atuam na cascata de GSH mediante disponibilização de CIS.

Como não existem relatos do uso de BME no congelamento de sêmen ovino, este trabalho objetiva determinar o efeito do BME associado ou não a CIS como aditivos ao diluente de congelamento de sêmen, e utilizar também a combinação destes dois antioxidantes nas etapas de MIV e CIV na produção *in vitro* de embriões ovinos.

2 OBJETIVOS

A. Objetivo geral

Melhorar a qualidade pós-descongelamento de sêmen de ovinos da raça Crioula Lanada e a eficiência da PIV de embriões ovinos, pela adição dos antioxidantes BME e cisteína, ao diluente de congelamento de sêmen e aos meios de MIV e CIV.

B. Objetivos específicos

- Determinar o efeito da adição de BME e CIS ao diluente de congelamento, na qualidade pós-descongelamento do sêmen de ovinos da raça Crioula Lanada;
- Determinar a eficiência dos antioxidantes BME e CIS na MIV e CIV de embriões ovinos.

3 ARTIGOS

3.1 Artigo 1. EFEITO ANTIOXIDANTE DE β -MERCAPTOETANOL E CISTEÍNA SOBRE A VIABILIDADE PÓS-DESCONGELAMENTO DE SÊMEN DE OVINOS DA RAÇA CRIOULA LANADA

Pradieé, Jorgea; Cardoso, Tainã, F.; Fernandes, Estela, S.; Lazzari, José César; Gonçalves, Alexander, O.; Gastal, Gustavo D.; da Rosa, Carlos Eduardo; Vieira, Arnaldo D.; Mondadori, Rafael G.; Pegoraro, L.M.C.; Lucia Jr., Thomaz.

Será submetido à revista Ciência Rural

(Formatado segunda as normas da revista Ciência Rural)

1 **Efeito antioxidante de β -mercaptoetanol e cisteína sobre a viabilidade pós-**
2 **descongelamento sêmen de ovinos da raça Crioula Lanada**

3
4 **Antioxidant effect of β -mercaptoethanol and cysteine on post-thawing sperm**
5 **viability in rams of Crioula Lanada breed**

6
7 **Resumo**

8 O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da inclusão dos antioxidantes
9 β -mercaptoetanol (BME) e cisteína no diluente de congelamento sobre a viabilidade
10 do sêmen ovino após o descongelamento, considerando que a geração de espécies
11 reativas de oxigênio (ROS) geradas a partir dos componentes celulares presentes no
12 sêmen é prejudicial para a viabilidade espermática. Amostras de sêmen de quatro
13 carneiros da raça Crioula Lanada foram coletadas com vagina artificial, duas vezes
14 por semana, totalizando 23 coletas. As amostras foram combinadas em *pool*,
15 incluindo sêmen dos quatro machos, e divididas em seis tratamentos: T1, Controle,
16 sem inclusão de antioxidante; T2, com 2mM BME; T3, com 5mM BME; T4, com
17 2mM BME e 5mM de cisteína; T5, com 5mM BME e 5mM de cisteína; e T6 com
18 5mM de cisteína. O sêmen foi diluído em tris-gema-glicerol e estocado em palhetas
19 de 0,25 mL contendo 100×10^6 espermatozoides. O processo de resfriamento e
20 congelamento foi realizado em máquina TK3000 e o descongelamento foi realizado
21 em banho-maria 37°C por 20 s. A motilidade espermática, a integridade da
22 membrana espermática e do acrossoma e a atividade mitocondrial, antes do
23 congelamento e após o descongelamento, não diferiram entre os tratamentos ($P >$
24 0,05). A quantificação de ROS e da atividade antioxidante total pós-
25 descongelamento também foram semelhantes entre os tratamentos ($P >$ 0,05). Nas
26 concentrações testadas, a inclusão de BME e cisteína, não influenciou a viabilidade
27 espermática pós-descongelamento.
28

29 **Abstract**

30 The objective of this study was to evaluate the effect of the inclusion of the
31 antioxidants β -mercaptoetanol (BME) and cysteine in freezing extenders on the post-
32 thawing ram sperm viability, considering that reactive oxygen species (ROS)
33 generated from cellular components present in sperm are detrimental to sperm
34 viability. Ejaculates were collected from four rams of the Crioula Lanada breed
35 through an artificial vagina, twice a week, totaling 23 per ram. Ejaculates were
36 pooled, including sperm from all four rams in the pools and subsequently split in six
37 treatments: Control, with no antioxidant; 2mM BME; 5mM BME; 2mM BME and
38 5mM cysteine; 5mM BME and 5mM cysteine; and 5mM cysteine. Sperm samples
39 were diluted in tris-egg yolk-glycerol and stored in 0.25 mL straws containing $100 \times$
40 10^6 spermatozoa. Cooling and freezing were conducted in a TK3000 machine and
41 thawing was done in water bath at 37°C for 20 s. Sperm motility, membrane
42 integrity, acrosome integrity and mitochondrial functionality, both pre-freezing and
43 post-thawing did not differ among treatments ($P >$ 0.05). The amount of ROS and
44 the total antioxidant activity were also similar across treatments ($P >$ 0.05). The

45 inclusion of BME and cysteine at the tested concentrations had no influence on post-
46 thawing sperm viability.

47

48 **1. Introdução**

49 Dentre os fatores que influenciam na qualidade espermática pós-descongelamento
50 estão os radicais livres, radicais hidroxil e as espécies reativas de oxigênio (ROS)
51 (peróxido de hidrogênio, ânion superóxido) que provocam a redução da motilidade
52 espermática (BILODEAU et al., 2001), além de comprometer sua viabilidade devido a
53 danos nas membranas e no material genético (SINHA et al., 1996; PERIS et al., 2007),
54 cuja integridade é imprescindível para a funcionalidade dos espermatozoides
55 criopreservados. A sensibilidade dos espermatozoides à lipoperoxidação e ao ataque de
56 radicais livres ocorre em função do alto teor de ácidos graxos poli-insaturados presente
57 em suas membranas e também da pouca quantidade de antioxidantes presentes no seu
58 citoplasma (AGARWAL et al., 2005). Os danos atribuídos aos radicais livres e as ROS
59 durante os processos de congelamento e descongelamento, podem ser reduzidos através
60 da suplementação de antioxidantes ao meio diluente.

61 Diferentes antioxidantes (vitamina E e seus análogos, catalase, GSH, superóxido
62 dismutase, cisteína) vêm sendo testados como adjuvantes incluídos nos diluentes usados
63 para congelamento de sêmen ovino (SICHERLE et al., 2011; MAIA et al., 2010;
64 BUCAK et al., 2008). Entretanto, os resultados obtidos ainda não permitiram um
65 incremento significativo na viabilidade espermática pós-congelamento, o que pode ter
66 ocorrido em função da rota de atuação destes antioxidantes, que não proporcionou a
67 adequada produção de antioxidantes intracelulares.

68 Para otimizar os efeitos antioxidantes, sugere-se a disponibilização de precursores
69 de glutathione (GSH), que é o principal antioxidante intracelular (LUBERDA, 2005).
70 Agentes derivados tióis como o β -mercaptoetanol (BME) atuam na cascata de GSH

71 mediante disponibilização de cisteína. Porém, como a cisteína disponibilizada no meio é
72 facilmente oxidada a cistina, não pode ser utilizada pela célula. A reação entre BME e
73 cistina produz uma mistura dissulfídica que é rapidamente reduzida e liberada no meio,
74 livre para reagir com outra cistina novamente. Com esta ação cíclica do BME, as células
75 são capazes de utilizar a cistina constantemente (ISHII et al., 1981). Além disso, o BME
76 também é um importante estimulador da síntese de RNA e de proteínas mitocondriais,
77 que são essenciais para a produção de enzimas requeridas para prover energia para
78 motilidade dos espermatozoides (SALEM et al., 1988). No entanto, não existem relatos
79 do uso dos antioxidantes BME e da cisteína no processo de congelamento de sêmen
80 ovino.

81 A raça Crioula Lanada é nativa da região Sul e é oriunda de uma série de
82 cruzamentos entre ovinos trazidos pelos colonizadores portugueses e espanhóis para o
83 Brasil (VAZ, 1993). Desta combinação, resultaram uma grande variabilidade genética
84 (ARAUJO et al., 2009) e uma elevada rusticidade (BRICARELLO et al., 2004).
85 Atualmente seu rebanho encontra-se reduzido, o que justifica a busca pela preservação
86 desta raça, visando a preservação de seus genes que podem ser de inestimável
87 importância para a manutenção da variabilidade genética da espécie ovina.

88 Este trabalho teve como objetivo determinar o efeito antioxidante do BME,
89 incluído isoladamente ou em associação com a cisteína no diluente de congelamento de
90 sêmen ovino, sobre a viabilidade pós-descongelamento de sêmen de ovinos da raça
91 Crioula Lanada.

92

93 **2. Materiais e métodos**

94 O experimento foi conduzido no Laboratório de Reprodução Animal do
95 Departamento de Patologia da Faculdade de Veterinária – UFPel e no Laboratório de

96 Reprodução Animal da EMBRAPA Clima Temperado, situados no município do Capão
97 do Leão, Rio Grande do Sul. Os testes bioquímicos foram realizados no Laboratório de
98 Zoofisiologia da Universidade Federal de Rio Grande (FURG).

99

100 **2.1 Processamento do sêmen e avaliações**

101 Quatro carneiros da raça Crioula Lanada, com idade entre 4 e 5 anos, foram
102 utilizados como doadores de sêmen, sendo realizadas 23 coletas. Os carneiros foram
103 mantidos nas instalações da EMBRAPA Clima Temperado, sob as mesmas condições de
104 manejo e alimentação.

105 Todos os indicadores de qualidade espermática foram avaliados antes e após o
106 descongelamento. Porém, a motilidade espermática continuou sendo avaliada a cada 30
107 minutos, durante duas horas após o descongelamento do sêmen. Após as avaliações pré-
108 congelamento, somente os ejaculados que apresentaram motilidade espermática maior
109 ou igual a 70% e vigor espermática maior ou igual 3, foram utilizados no experimento
110 (CBRA, 1998). A motilidade e o vigor foram avaliados com visualização em
111 microscopia óptica em aumento de 200x, com uma alíquota de 5µl em uma lâmina
112 coberta por lamínula, ambas previamente aquecidas a 37°C (BEARDEN & FUQUAY,
113 1997; CBRA, 1998).

114 A análise da morfologia espermática foi realizada em microscopia óptica de
115 contraste de fase, sob lente de imersão com aumento de 1000x. Para a avaliação da
116 concentração espermática, o sêmen foi diluído em solução de formol salina na proporção
117 de 1:400 e avaliado em câmera de Neubauer sob microscopia óptica comum, em
118 aumento de 200x. Após a avaliação da concentração dos ejaculados, as amostras de
119 sêmen dos quatro carneiros foram combinadas (*pool*), de modo que cada um

120 contribuísse com a mesma concentração de espermatozoides viáveis (250×10^6
121 espermatozoides), totalizando 1×10^9 espermatozoides no *pool* e 100×10^6
122 espermatozoides na palheta de 0,25 mL. O diluente base utilizado para o congelamento
123 do sêmen foi tris-gema-glicerol (EVANS & MAXWELL, 1987).

124 As amostras foram divididas em seis tratamentos: T1, Controle, sem antioxidantes;
125 T2, com 2mM BME; T3, com 5mM BME; T4, com 2mM BME e 5mM CIS; T5, com
126 5mM BME e 5mM de CIS; e T6, com 5mM de CIS. A curva de
127 resfriamento/congelamento foi realizada em equipamento de congelamento automático
128 (TK3000[®], Uberaba, MG), em programa específico para ovinos (P3S1), em que a
129 redução da temperatura na rampa positiva se dava a $0,25^\circ\text{C}/\text{minuto}$ até chegar a 5°C ,
130 permanecendo nesta temperatura durante 1 hora. Logo em seguida iniciava-se a rampa
131 negativa, em caixa de isopor contendo 7 cm de nitrogênio líquido, com redução de
132 $20^\circ\text{C}/\text{minuto}$ até a temperatura de -120°C , a seguir as palhetas eram imersas em
133 nitrogênio líquido (-196°C). Já o descongelamento foi realizado em banho-maria a 37°C
134 por 20 segundos.

135 A integridade da membrana plasmática foi avaliada através de coloração
136 fluorescente utilizando-se a combinação dos corantes diacetato de carboxifluoresceína
137 (CFDA) ($20 \mu\text{M}$) (C4916, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) e Iodeto de
138 Propídio (IP) ($73 \mu\text{M}$) (P4170, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA)
139 (HARRISON & VICKERS, 1990), em microscópio de epifluorescência, com o filtro de
140 excitação 450-490 nm, em aumento de 400x, sendo avaliadas 200 células por lâmina. Os
141 espermatozoides corados em verde eram considerados íntegros (membrana plasmática
142 íntegra) e os corados de vermelho ou de verde e vermelho simultaneamente, eram
143 classificados como não íntegros (membrana plasmática lesada).

144 Para a avaliação da integridade do acrossoma os espermatozoides foram corados
145 com FITC-PNA (L7381, Sigma-Aldrich[®] Chemical Company (St. Louis, MI, EUA),
146 utilizando a técnica adaptada de Tabuchi et al. (2008). Foram contadas 200 células por
147 lâmina, avaliadas em aumento de 1000x, em microscópio de epifluorescência (Olympus
148 BX 51, América INC, São Paulo, SP. Brasil), em filtro WU com excitações de 450-
149 490nm e emissão de 520nm. Os acrossomas foram considerados íntegros quando
150 apresentaram conformação normal e coloração verde e, quando apresentaram coloração
151 vermelha e conformação anormal, foram considerados lesados.

152 A avaliação da atividade mitocondrial foi realizada através de técnica descrita por
153 Evenson et al. (1982), utilizando os corantes Rodamina 123 (0,2 mM) (R8004, Sigma
154 Chemical Company, St. Louis, MO, USA) e Iodeto de Propídio (IP) (73 μ M) (P4170,
155 Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). Foram contadas 200 células por
156 lâmina, avaliadas em aumento de 400x em microscópio de epifluorescência (Olympus
157 BX 51, América INC, São Paulo, SP. Brasil), em filtro WU com excitações de 450-490
158 nm e emissão de 516-617nm. As células que apresentavam a peça intermediária com
159 uma intensa fluorescência verde foram consideradas com mitocôndrias íntegras
160 (funcionalmente ativas), enquanto as células sem intensa fluorescência verde na peça
161 intermediária foram consideradas não funcionais.

162 **2.2 Análises bioquímicas**

163 **2.2.1 Espécies reativas de oxigênio (ROS)**

164 A mensuração das ROS foi feita através de um teste de cinética realizado em
165 fluorímetro (Victor 2, Perkin Elmer[®]), a partir de protocolo modificado de MYHRE &
166 FONNUM (2001). Após o descongelamento do sêmen em banho-maria a 37°C durante

167 30 s, o mesmo foi depositado em microtubos de 1,5 mL onde foi centrifugado por duas
168 vezes a 800 G por 10 min com descarte do sobrenadante e ressuspensão do pellet com 1
169 mL de PBS livre de cálcio e magnésio. Foram retirados 400 µl do volume e congelado
170 para posterior análise da capacidade antioxidante total (TOSC). Foram então
171 adicionados 600 µl do preparo da sonda fluorescente 2'7'Diacetato de
172 Diclorofluoresceína H₂DCF-DA (40µM em PBS) (35845, Sigma Chemical Company,
173 St. Louis, MO, USA) para ressuspensão do pellet, homogeneizado por 5 segundos em
174 vórtex, permanecendo em incubação com a sonda por 30 min a 36°C. Logo foi realizada
175 a última centrifugação e lavagem com 600µl de PBS para retirada do excesso da sonda
176 H₂DCF-DA e posterior leitura no fluorímetro. Foram colocadas 160µl das amostras, em
177 triplicatas, em placas brancas de 96 poços (Corning[®] 3912). A leitura foi realizada em
178 12 ciclos com intervalo de 4 min e agitação de 2 s antes e depois de cada ciclo em uma
179 temperatura de 36°C.

180 A geração de ROS foi determinada através da integração da área da curva de
181 fluorescência pelo tempo, sendo os resultados expressos por UFx10⁷.

182 **2.2.2 Capacidade antioxidante total (ACAP)**

183 A capacidade antioxidante total foi mensurada contra os radicais peróxidos,
184 gerados pela decomposição térmica a 36°C, de 2,2' -azobis (2-metilpropionamida)
185 dihidroclorato (ABAP), segundo AMADO et al. (2009). Para a realização do protocolo,
186 uma alíquota de 500 µL do sêmen descongelado foi armazenada a -18°C por no máximo
187 15 dias para posterior análise. No momento da análise, a alíquota foi descongelada a
188 temperatura ambiente e sonicada por 5 segundos e, em seguida, centrifugada a 800 G
189 por 10min, sendo o pellet desprezado. Em uma placa de 96 poços (Corning 3912) foi
190 adicionado 125 µL de tampão de reação (PBS), sendo acrescido uma alíquota de 10 µL

191 de cada amostra em 4 poços. Em dois poços foram acrescentados 7,5 µL de água Milli-
192 Q e nos outros dois, 7,5 µL de solução de ABAP (20 µM), sendo as amostras feitas em
193 duplicatas. Em seguida foram adicionados 10 µL de solução da sonda H2DCF-DA (16
194 µM) em todos os poços para leitura em fluorímetro durante 30min com intervalo de
195 5min, em temperatura controlada de 36°C, usando comprimentos de onda de excitação
196 de 488 nm e um comprimento de onda de emissão de 529 nm.

197 O resultado final, ou seja, a capacidade antioxidante contra os radicais peróxidos foi
198 obtida pela diferença entre a área ROS com e sem ABAP relacionado à área ROS sem
199 ABAP.

200

201 **3.2.3 Análise estatística**

202 As respostas avaliadas antes e após congelamento foram as seguintes: motilidade
203 espermática; integridade da membrana espermática e do acrossoma, e atividade
204 mitocondrial dos espermatozoides. Também foram analisados os resultados dos testes de
205 espécies reativas de oxigênio (ROS) e capacidade antioxidante total (ACAP) pós-
206 descongelamento. As respostas, integridade de membrana e acrossoma antes do
207 congelamento, foram comparadas entre os tratamentos por análise de variância, com
208 comparação de médias pelo teste de Tukey. Nos demais casos, nos quais as respostas
209 não apresentaram normalidade, segundo o teste de Shapiro-Wilk, foi utilizado um teste
210 não paramétrico (análise de variância de Kruskal-Wallis). As análises estatísticas foram
211 realizadas pelo uso do programa Statistix® (2008).

212

213 **4 Resultados**

214 Na Tabela 1 são mostrados os resultados das avaliações de qualidade seminal antes e
215 depois do descongelamento, respectivamente. Nenhuma das respostas diferiu entre os
216 tratamentos ($P > 0,05$). A avaliação da motilidade espermática em dois períodos após o
217 descongelamento (Tabela 2) indicou que os tratamentos não afetaram a sobrevivência
218 das células durante este período ($P > 0,05$).

219 As análises bioquímicas de ROS e TOSC, não apresentaram diferença entre os
220 tratamentos ($P > 0,05$) (Tabela 3).

221

222 **5 Discussão**

223 O presente trabalho é o primeiro que utiliza a associação entre os antioxidantes tióis,
224 BME e cisteína, no congelamento de sêmen ovino. Esta informação agrega
225 conhecimento sobre a eficiência do processo de congelamento do sêmen ovino, no qual
226 a maior produção de ROS ocorre durante o resfriamento e o descongelamento. Por
227 ocasião deste estresse oxidativo, há um aumento da peroxidação lipídica na membrana
228 do espermatozoide (CHATTERJEE & GAGNON, 2001). As células espermáticas de
229 mamíferos contém uma alta proporção de ácidos graxos poli-insaturados, sendo mais
230 susceptíveis a peroxidação lipídica. Além do mais, como a composição lipídica da
231 membrana espermática é um dos principais determinantes da viabilidade celular
232 (BUCAK et al., 2008), tais danos estruturais diminuem a motilidade espermática. Por
233 isso, tem se estudado a adição de substâncias antioxidantes no meio de congelamento e
234 descongelamento, a fim de controlar a geração de ROS para diminuir a lipoperoxidação,
235 melhorando os resultados pós-descongelamento.

236 No presente estudo, assumiu-se que a concentração de 5 mM de cisteína (BUCAK et
237 al., 2008) seria a mais indicada para sêmen ovino, tendo sido associada ao BME, em
238 duas concentrações diferentes, 2 mM e 5 mM, no congelamento do sêmen. Tais

239 concentrações de BME foram determinadas em pré-experimentos, nos quais foi utilizada
240 a concentração de 7,5 mM, sem que tenham sido observadas diferenças na motilidade
241 espermática pós-descongelamento. Porém, essa concentração provocou redução na
242 integridade de membrana (dados não publicados), indicando que esta poderia interferir
243 nas proteínas de membrana e assim diminuir a viabilidade espermática. Ainda que
244 diversos autores tenham comprovado a ação positiva da cisteína, utilizada isoladamente,
245 como antioxidante no sêmen de ovinos (BUCAK et al., 2008), bovinos (SARIOZKAN
246 et al., 2009; BILODEAU et al., 2001) e suínos (FUNAHASHI & SANO, 2005;
247 YAMAGUCHI et al., 2012), o presente experimento não comprovou este efeito aditivo.

248 A associação de antioxidantes tióis, tais como, BME e cisteína vêm sendo estudada
249 em células (ISHII, et al 1981) e embriões (BAI et al, 2008; HOSSEINI et al, 2011), em
250 várias espécies animais. O interesse por estes compostos se justifica por efeitos positivos
251 gerados pela disponibilização destes precursores na formação de um dos principais
252 antioxidantes intracelulares, a glutathiona (GSH) (LUBERDA, 2005; BUCAK et al.,
253 2007). Porém, nossos resultados não comprovaram efeitos positivos para o
254 congelamento do sêmen ovino.

255 Agentes tióis (BME e N-acetilcisteína) em concentração acima de 0,5 mM permitem
256 a manutenção da motilidade espermática por até 6 h pós-descongelamento para sêmen
257 bovino (BILODEAU et al.,2001). Portanto, o efeito antioxidante do BME foi tão
258 eficiente quanto o efeito de outros produtos como a cisteína e n-acetilcisteína, sendo
259 associado com a manutenção da motilidade espermática mesmo em presença de estresse
260 oxidativo (H₂O₂). Estes achados corroboram os resultados do presente experimento, pois
261 o tratamento contendo somente cisteína não diferiu dos tratamentos contendo BME, em
262 nenhum dos parâmetros testados. No entanto, ainda que o contato dos antioxidantes com
263 as células tenha ocorrido durante um período mais longo, as concentrações testadas não

264 foram deletérias para as células espermáticas, mas não proporcionaram manutenção da
265 motilidade após o descongelamento.

266 Ainda que durante o resfriamento do sêmen ocorra a produção de radicais livres,
267 aumentando o estresse oxidativo (CHATERJEE & GAGNON, 2001), a adição dos
268 antioxidantes durante esse período não foi benéfica. A adição de BME ao sêmen,
269 associado ou não a outra substância antioxidante, foi estudada em bovinos (BILODEAU
270 et al., 2001; TALEVI et al., 2007), ovinos (SALEM et al., 1988) e suínos
271 (YAMAGUCHI et al., 2012), porém com adição pós-descongelamento, o que
272 aumentaria o número de células funcionais e inibiria a capacitação espontânea
273 (YAMAGUCHI et al., 2012). Porém, como os antioxidantes foram adicionados antes do
274 resfriamento, o longo período de contato com as células (durante o resfriamento, o
275 congelamento e armazenamento) talvez explique a ausência de efeito benéfico do
276 antioxidante, o qual pode ter sido totalmente consumido durante este período.

277 Outro fator que pode ter influenciado nos resultados do presente experimento é a
278 composição do diluente utilizado para congelamento (tris + gema de ovo), a qual, por si
279 só, poderia apresentar potencial efeito antioxidante, pois estes componentes são capazes
280 de reduzir peróxido de hidrogênio, radicais superóxido e óxido nítrico no sêmen de
281 bovinos (CHATTERJEE et al., 2001). Porém, mesmo com uma composição similar do
282 diluente de congelamento, o presente estudo não diferenciou e os tratamentos contendo
283 BME e CIS, isoladamente ou associados, nos testes de ROS e ACAP.

284

285 **6 Conclusão**

286

287 A inclusão dos antioxidantes BME e cisteína, nas concentrações utilizadas, no
288 diluente de congelamento para ovinos, isoladamente ou em associação, não promoveram

289 benefícios para a qualidade seminal pós-descongelamento, não sendo capazes de reduzir
290 os radicais livres nem aumentar a capacidade antioxidante total.

291

292

293

294

295

296

297 Aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pelotas, sob o número
298 5541.

299

300

301 **Agradecimentos:**

302 EMBRAPA Clima Temperado (Pelotas-RS).

303 EMBRAPA Pecuária Sul (Bagé-RS).

304

305 **7 Bibliografia**

306

307 AGARWAL, A. et al. Prevention of oxidative stress injury to sperm. **Journal of**
308 **Andrology**, v.26, p.654-660, 2005. Disponível em: <
309 [http://www.andrologyjournal.org/cgi/reprint/26/6/654?maxtoshow=&hits=10&RESULT](http://www.andrologyjournal.org/cgi/reprint/26/6/654?maxtoshow=&hits=10&RESULTFORMAT=&author1=Agarwal&searchid=1&FIRSTINDEX=0&volume=26&firstpage=654&resourcetype=HWCIT)
310 [FORMAT=&author1=Agarwal&searchid=1&FIRSTINDEX=0&volume=26&firstpage](http://www.andrologyjournal.org/cgi/reprint/26/6/654?maxtoshow=&hits=10&RESULTFORMAT=&author1=Agarwal&searchid=1&FIRSTINDEX=0&volume=26&firstpage=654&resourcetype=HWCIT)
311 [=654&resourcetype=HWCIT](http://www.andrologyjournal.org/cgi/reprint/26/6/654?maxtoshow=&hits=10&RESULTFORMAT=&author1=Agarwal&searchid=1&FIRSTINDEX=0&volume=26&firstpage=654&resourcetype=HWCIT)>. Acessado em: 05 fev. 2013. DOI:
312 10.2164/jandrol.05016.

313

314 AMADO, L.L. et al. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy
315 radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. **Science of**
316 **the Total Environment**, v.407, p. 2115 – 2123, 2009. Disponível em: <
317 <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.038> Acessado em: 05 fev. 2013. DOI:
318 10.1016/j.scitotenv.2008.11.038>

319 ARAUJO, A.R. et al. Manejo de diversidade genética em um núcleo de conservação da
320 raça ovina Crioula Lanada (*Ovis Aries*), Brasil. In: VII Simpósio de recursos genéticos
321 para América Latina (SIRGEALC), 2009. Pucón, Chile. **Anais...**2009. p. 221.

322 BAI, J. et al. Effect of 2-mercaptoethanol and cysteine supplementation during *in vitro*
323 maturation on the developmental competence of oocytes from hormone-stimulated
324 lambs. **Theriogenology**, v. 70, p. 758–764, 2008. Disponível em:
325 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.053>>. Acessado em: 05 fev. 2013.
326 DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.04.053.

327 BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. Semen evaluation. In: BEARDEN, H.J.; FUQUAY,
328 J.W. **Applied Animal Reproduction**. 4th Ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997.p.159-
329 170.

330 BRICARELLO, P. A. et al. Worm burden and immunological responses in Corriedale
331 and Crioula Lanada sheep following natural infection with *Haemonchus contortus*.
332 **Small Ruminant Research**, v. 51, p. 75-83, 2004. Disponível em:
333 <[http://dx.doi.org/10.1016/S0921-4488\(03\)00188-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0921-4488(03)00188-3)>. Acessado em: 05 fev.2013. DOI:
334 10.1016/S0921-4488(03)00188-3.

335 BILODEAU, J.F. et al. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in
336 cryopreserved bull semen. **Theriogenology** v. 56, p. 275-286, 2001. Disponível em: <
337 [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00562-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00562-3)>. Acessado em: 05 fev.2013. DOI:
338 10.1016/S0093-691X(01)00562-3.

339 BUCAK, M. N. et al. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram
340 semen after the freeze–thawing process. **Small Ruminant Research**, v.75, p.128–134,
341 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2007.09.002>>. Acessado
342 em: 05 fev. 2013. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2007.09.002.

343

344 BUCAK, M.N. et al. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on
345 ram semen. Microscopic and oxidative stress parametrs after freeze-thawing process.
346 **Theriogenology**, v.67, p.1060-1067, 2007. Disponível em: <
347 <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.12.004>>. Acessado em: 05 fev 2013.
348 DOI: 10.1016/j.theriogenology.2006.12.004.

349

350 CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Colégio
351 Brasileiro de Reprodução Animal. 2ª Ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998.

352

353 CHATTERJEE, S.; GAGNON, C. Production of reactive oxygen species by
354 spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. **Molecular reproduction and**

355 **development**, v.59, p.451-458, 2001. Disponível em:

356 <<http://dx.doi.org/10.1002/mrd.1052>>. Acessado em: 05 fev. 2013. DOI:

357 10.1002/mrd.1052.

358 EVANS, G. & MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of semen. In:____. **Salamon's**

359 **Artificial Insemination of sheep and goats**. Ed. Butterworths, 1987. Cap.14, p.122-

360 139.

361 EVENSON, D.P. et al. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell
362 viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. **The Journal of**

363 **Histochemistry and Cytochemistry**, v .30, p. 279-280, 1982. Disponível em:

364 <<http://dx.doi.org/10.1177/30.3.6174566>> Acessado em: 05 fev. 2013. DOI:

365 10.1177/30.3.6174566.

366

367 FUNAHASHI, H.; SANO,T. Select antioxidants improve the function of extended boar
368 semen stored at 10°C. **Theriogenology**, v. 63, p.1605–1616, 2005. Disponível em:

369 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.06.016>> Acessado em: 05 fev. 2013.

370 DOI: 10.1016/j.theriogenology.2004.06.016.

371

372 HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane

373 integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p.

374 343-352, 1990. Disponível em:< <http://dx.doi.org/10.1530/jrf.0.0880343>> Acessado em:
375 05 fev. 2013. DOI: 10.1530/jrf.0.0880343.

376

377 HOSSEINI, S. O. et al. Effect of culture condition and cell-permeable superoxide
378 dismutase on levels of reactive oxygen species (ROS) production in “*in vitro*” produced
379 sheep embryos. **Small Ruminant Research**,v. 97,p.88–93, 2011. Disponível em:
380 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.02.010>>Acessado em: 05 fev. 2013. DOI:
381 10.1016/j.smallrumres.2011.02.010.

382

383 ISHII, T. et al. Mechanism of Growth Stimulation of L1210 Cells by 2-Mercaptoethanol
384 *in vitro*: Role of the mixed disulfide of 2-mercaptoethanol and cysteine. **The Journal of**
385 **Biologic Chemistry**, v 256,N. 23, p. 12387-12392, 1981.

386

387 LUBERDA, Z. The role of glutathione in mammalian gametes. **Reproductive Biology**,
388 v.5,p.5-17, 2005. Disponível em: < [http://repbiol.pan.olsztyn.pl/2010/06/11/the-role-of-](http://repbiol.pan.olsztyn.pl/2010/06/11/the-role-of-glutathione-in-mammalian-gametes/)
389 [glutathione-in-mammalian-gametes/](http://repbiol.pan.olsztyn.pl/2010/06/11/the-role-of-glutathione-in-mammalian-gametes/)>

390

391 MAIA, M.S. et al. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-
392 thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. **Animal**
393 **Reproduction Science**, v. 122, Issues 1-2, p.118-123, 2010. Disponível em:
394 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.004>>. Acessado em: 05 fev. 2013. DOI:
395 10.1016/j.anireprosci.2010.08.004.

396

397 MYHRE, O.; FONNUM, F. The effect of aliphatic, naphthenic, and aromatic
398 hydrocarbons on production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in

399 rat brain synaptosome fraction: the involvement of calcium, nitric oxide synthase,
400 mitochondria, and phospholipase A. **Biochemical Pharmacology**, n.62, p.119–128
401 2001. Disponível em:< [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952\(01\)00652-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952(01)00652-9)>. Acessado
402 em 05 fev. 2013. DOI: 10.1016/S0006-2952(01)00652-9.

403

404 PERIS, S.I. et al. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA
405 integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. **Molecular**
406 **Reproduction and Development**, v. 74, p.878–892, 2007. Disponível em:
407 <<http://dx.doi.org/10.1002/mrd.20686>>. Acessado em 05 fev. 2013. DOI:
408 10.1002/mrd.20686.

409

410 SARIÖZKAN, S. et al. The influence of cysteine and taurine on microscopic–oxidative
411 stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation.
412 **Cryobiology**, v. 58, p.134–138, 2009. Disponível em:
413 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.11.006>>. Acessado em: 05 fev. 2013. DOI:
414 10.1016/j.cryobiol.2008.11.006.

415

416 SALEM, M.H. et al. Effect of incubation conditions, inhibitors, 2-mercaptoethanol and
417 testosterone on rna synthesis in ram spermatozoa. **Theriogenology**, v.30, p.339-
418 347,1988. Disponível em:<[http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X\(88\)90181-1](http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X(88)90181-1)> Acessado
419 em: 05 fev. 2013. DOI: 10.1016/0093-691X(88)90181-1.

420

421 SICHERLE, C.C. et al. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in
422 frozen-thawed ram semen supplemented with catalase or Trolox. **Small Ruminant**
423 **Research**,v. 95, p.144–149, 2011. Disponível em:<

424 <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.10.011>> Acessado em: 05 fev. 2013. DOI:
425 10.1016/j.smallrumres.2010.10.011.

426

427 SINHA, M.P. et al. The effect of glutathione on the motility, enzyme leakage and
428 fertility of frozen goat semen. **Animal Reproduction Science**, v.41, p.237-243, 1996.

429 Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/0378-4320\(95\)01450-0](http://dx.doi.org/10.1016/0378-4320(95)01450-0)> Acessado em: 05
430 fev. 2013. DOI: 10.1016/0378-4320(95)01450-0.

431

432 STATISTIX®, STATISTIX 9 ANALYTICAL SOFTWARE. TALLAHASSEE, FL,
433 USA. 2008.

434

435 TABUCHI, T. et al. A 32 kDA tyrosine phosphorylated protein shows a protease
436 dependent increase in dead boar spermatozoa. **Journal of Reproduction and**
437 **Development**, v.54, p.502-507, 2008. Disponível em: <

438 <http://dx.doi.org/10.1262/jrd.20021>> Acessado em: 05 fev. 2013. DOI:
439 10.1262/jrd.20021.

440

441 TALEVI, R. et al. Redox regulation of sperm surface thiols modulates adhesion to the
442 fallopian tube epithelium. **Biology of Reproduction** v.76, p.728–735, 2007. Disponível
443 em: < <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.106.056028>> Acessado em: 05 fev. 2013.
444 DOI:10.1095/biolreprod.106.056028.

445 VAZ, C.M.S.L. Situação atual da preservação e avaliação de ovinos Crioulos Lanados
446 no Brasil. In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. **Anais...**Rio de
447 Janeiro, 1993.p. 207.

448 YAMAGUCHI, S.; FUNAHASHI, H. Effect of the addition of beta-mercaptoethanol to
449 a thawing solution supplemented with caffeine on the function of frozen-thawed boar
450 sperm and on the fertility of sows after artificial insemination. **Theriogenology**, v.77,
451 p.926–32,2012.Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.09.023>>
452 Acessado em: 05 fev. 2013. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2011.09.023.
453

454 Tabela 1: Taxas de motilidade, integridade da membrana (MEMB) e do acrossoma (ACR) e atividade mitocondrial (MIT) de sêmen ovino pré e
 455 pós-descongelamento por tratamento*

Variáveis	Pré congelamento				Pós descongelamento			
	Motilidade	MEMB	ACR	MIT	Motilidade	MEMB	ACR	MIT
Controle	80,4 ± 0,4	74,9 ± 2,1	52,4 ± 3,2	74,9 ± 1,8	31,3 ± 1,6	42,3 ± 3,7	40,9 ± 1,9	64,5 ± 3,0
2mM BME	80,0 ± 0,6	74,2 ± 2,3	52,4 ± 3,8	79,7 ± 2,5	25,6 ± 1,4	40,4 ± 3,8	35,9 ± 2,8	58,0 ± 2,9
5mM BME	78,6 ± 0,9	73,4 ± 2,5	58,2 ± 4,3	78,7 ± 2,3	25,9 ± 1,4	42,1 ± 4,8	38,8 ± 2,2	61,9 ± 2,8
2mM BME + 5 mM Cisteína	80,4 ± 0,4	71,7 ± 2,3	47,6 ± 3,9	76,5 ± 2,4	24,5 ± 1,6	45,1 ± 3,5	40,8 ± 3,3	55,3 ± 3,6
5mM BME + 5 mM Cisteína	80,4 ± 0,4	76,0 ± 1,6	51,7 ± 3,4	79,8 ± 2,8	26,0 ± 1,6	42,7 ± 2,9	45,6 ± 2,0	56,6 ± 3,8
5 mM Cisteína	80,4 ± 0,4	74,0 ± 2,2	47,5 ± 3,7	77,5 ± 2,7	23,9 ± 1,6	38,9 ± 4,0	44,1 ± 1,7	62,0 ± 3,4

456 BME: β -mercaptoetanol

457 *Médias \pm EPM não diferiram ($P > 0,05$) pela análise de variância, com comparação de médias pelo teste de Tukey para os parâmetros de
 458 integridade de membrana e acrossoma antes do congelamento, para os demais parâmetros foi utilizado método não paramétrico de análise de
 459 variância por Kruskal-Wallis.

460

461 Tabela 2: Motilidade espermática de sêmen ovino em dois períodos pós-
462 descongelamento por tratamento

Variáveis	Motilidade pós-descongelamento (%)	
	Após 1 h	Após 2 h
Controle	28,2 ± 1,6	19,5 ± 1,3
2 mM BME	28,2 ± 1,6	19,7 ± 1,5
5 mM BME	24.5 ± 1,5	19.3 ± 1,5
2 mM BME + 5 mM Cisteína	24.5 ± 1,5	18.6 ± 1,0
5 mM BME + 5 mM Cisteína	23.4 ± 1,7	18.6 ± 1,3
5mM Cisteína	21.3 ± 1,7	14.7 ± 1,5

463 BME: β -mercaptoetanol

464 *Médias \pm EPM não diferiram ($P > 0,05$)

465

466 Tabela 3: Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e capacidade antioxidante
 467 total (ACAP) de sêmen ovino pós-descongelamento por tratamento

Variáveis	ROS (Área de fluorescência x 10 ⁷)	ACAP (1/Área relativa)
Controle	1,3 ± 0,1 (1,1)	82,2 ± 7,7 (71,7)
2 mM BME	1,1 ± 0,1 (1,1)	96,2 ± 10,5 (88,4)
5 mM BME	1,1 ± 0,1 (0,9)	113,9 ± 35,5 (71,2)
2 mM BME + 5 mM Cisteína	1,1 ± 0,5 (1,0)	75,3 ± 7,6 (71,7)
5 mM BME + 5 mM Cisteína	1,0 ± 0,1 (0,9)	108,6 ± 14,3 (96,1)
5mM Cisteína	1,2 ± 0,1 (1,1)	82,2 ± 5,7 (75,0)

468 BME: β-mercaptoetanol

469 *Médias ± EPM não diferiram (P > 0,05). Valores entre parênteses são as medianas

**3.2 Artigo 2 EFEITO DOS ANTIOXIDANTES β -MERCAPTOETANOL E
CISTEÍNA SOBRE A MATURAÇÃO E CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES
OVINOS**

Pradieé, Jorgea; Viana, Liziane L.; Santos, Elisa C. da Silva; Gonçalves,
Alexander O.; Madeira, Elisangela M.; Cardoso, F. Tainã; Lazzari, José César;
Vieira, Arnaldo D.; Mondadori, Rafael G.; Pegoraro, Lígia M.C.; Lucia, Jr.,
Thomaz.

Será submetido à revista Ciência Rural
(Formatado segunda as normas da revista Ciência Rural)

1 Efeito dos antioxidantes β -mercaptoetanol e cisteína sobre a maturação e cultivo *in*

2 *vitro* de embriões ovinos

3 Effect of antioxidants β -mercaptoethanol and cysteine on maturation and *in vitro*

4 culture of sheep embryos

5

6 **Resumo**

7 O objetivo do presente trabalho foi avaliar a adição dos antioxidantes β -mercaptoetanol
8 (BME), e a associação entre BME e cisteína (CIS) na maturação e cultivo *in vitro* de
9 embriões ovinos. No primeiro experimento foi utilizada a concentração de 20 μ M de
10 BME na MIV e CIV de embriões, comparada a um tratamento controle sem adição dos
11 referidos antioxidantes. Não houve efeito deletério do antioxidante sobre a taxa de
12 clivagem (Controle: 70,0%; BME: 69,8%). Porém, a taxa de desenvolvimento até o
13 estágio de blastocisto no tratamento BME (5,2%) foi inferior ($P < 0,001$) à do controle
14 (16,9%). No segundo experimento, foi testada a associação de 50 μ M de BME e 600 μ M
15 de CIS, na MIV e CIV. Não houve diferença entre o tratamento controle sem oxidante e
16 o tratamento com adição de BME/CIS ($P > 0,05$), quanto às taxas de clivagem (60,3% e
17 64,3%, respectivamente) e de desenvolvimento embrionário (33,6% e 36,6%,
18 respectivamente). A adição isolada de 20 μ M de BME na MIV e CIV de embriões
19 ovinos foi associada com redução no desenvolvimento embrionário até o estágio de
20 blastocisto. A adição dos antioxidantes BME e cisteína, em associação, não influenciou
21 as taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocistos.

22

23 **Abstract**

24 The objective of the present study was to evaluate the inclusion of the antioxidants β -
25 mercaptoetanol (BME) and of the association of BME and cysteine on the *in vitro*
26 maturation (IVM) and culture (IVC) of ovine embryos. In the first experiment, 20 μ M
27 BME was tested in both the IVM and IVC of embryos, in comparison with a control
28 treatment with no inclusion of antioxidants. The Control and BME treatments presented
29 similar ($P > 0.05$) cleavage rates (70.0% and 69.8%, respectively), but the rate of
30 embryo development to blastocyst for the BME treatment (5.2%) was lower ($P < 0.001$)
31 than that observed for the control treatment (16.9%). In the second experiment, the
32 tested concentrations were 50 μ M for BME and 600 μ M for cysteine. The control
33 treatment and the treatment including both antioxidants presented similar ($P > 0,05$)
34 rates of cleavage (60.3% and 64.3%, respectively) and embryo development (33.6% and
35 36.6%, respectively). The inclusion of 20 μ M BME is associated with reduced
36 development to the blastocyst stage. The combined inclusion of BME and cysteine does
37 not influence cleavage and embryo development rates.

38

39 **1. INTRODUÇÃO**

41 O estresse oxidativo é uma das causas de comprometimento do desenvolvimento de
42 embriões *in vitro* (DE MATOS et al., 2002), em função da diferença entre a produção de
43 espécies reativas de oxigênio (ROS), radicais livres e peróxido de hidrogênio, e a ação
44 de agentes antioxidantes capazes de neutralizar o potencial oxidativo de tais moléculas.

45 Durante os processos de maturação do oócito, fecundação e desenvolvimento
46 embrionário *in vivo*, antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos estão presentes no
47 líquido folicular, nos complexos *cumulus oophorus* (CCO) e nas secreções do trato
48 reprodutivo controlando a ação de ROS e radicais livres (LIVINGSTON et al., 2009), ao
49 contrário do que ocorre *in vitro*. Enquanto no cultivo *in vitro* (CIV), os embriões são
50 submetidos a condições subótimas e assim a produção de ROS aumenta além dos níveis
51 encontrados *in vivo*. Este desequilíbrio é chamado de estresse oxidativo,
52 comprometendo o desenvolvimento e viabilidade embrionária (GUERIN et al., 2001).

53 Visando mimetizar as condições *in vivo*, onde sistemas enzimáticos específicos
54 atuam, antioxidantes estão sendo cada vez mais utilizados na produção *in vitro* (PIV) de
55 embriões na tentativa de diminuir os danos causados às células.

56 Antioxidantes são agentes redutores, como compostos tióis de baixo peso molecular
57 que induzem a síntese de glutathione (GSH) (DE MATOS et al., 2002; BAI et al, 2008;
58 CHOE et al., 2010; HOSSEINI et al., 2011). A GSH é um tripeptídeo redutor (γ -
59 glutamil-cisteinil-glicine), envolvido em vários mecanismos do metabolismo celular:
60 transporte de aminoácidos; síntese de proteínas e de DNA, e proteção das células contra
61 danos oxidativos.

62 A cisteína é um dos aminoácidos envolvidos na síntese de GSH no oócito (DE
63 MATOS et al., 1996), mediada pelas células do CCO (DE MATOS et al., 1997). A
64 disponibilidade de cisteína no meio de MIV parece ser limitante na síntese de GSH em
65 oócitos de mamíferos. Em geral, a concentração de cisteína usada é menor do que a de

66 cistina por causa da sua auto-oxidação (DE MATOS et al., 2000). A taxa de oxidação de
67 cisteína sugere que sua quantidade livre durante as primeiras horas na MIV seja
68 suficiente para a síntese de GSH. Assim, é possível que a cistina gerada pela auto-
69 oxidação de cisteína, seja novamente convertida em cisteína pelas células do CCO e
70 incorporada ao embrião, gerando GSH.

71 O transporte da cistina pelo BME é realizado pela formação de um composto
72 dissulfídico, que facilita a absorção da cisteína dentro da célula (ISCHII et al., 1981).
73 Portanto, compostos tiol de baixo peso molecular, como o BME, podem reduzir a cistina
74 em cisteína, melhorando a síntese de GSH pelo oócito. Segundo TAKAHASHI et al.
75 (2002), a função do BME seria captar a cisteína, formando um composto que permite a
76 sua entrada no embrião, o que está associado com o metabolismo da GSH, favorecendo
77 as condições intracelulares para suportar a fecundação e o desenvolvimento embrionário
78 (DE MATOS & FURNOS, 2000).

79 No entanto, os vários estudos conduzidos em diferentes espécies, não foram
80 conclusivos em identificar o antioxidante mais eficiente na PIV. No que se refere à PIV
81 de embriões ovinos, sabe-se que na etapa de MIV, a cisteína e a cisteamina contribuem
82 com o aumento de GSH, mesmo em oócitos com poucas células do CCO (DE MATOS
83 et al., 1997). No CIV, os estágios de mórula e de embrião de 16 células seriam as fases
84 com maior produção de ROS (HOSSEINI et al., 2011), pois nestes estágios de pré-
85 compactação há um aumento na fosforilação oxidativa pela produção de ATP
86 (THOMPSON, 2000), devido ao aumento na demanda energética pela compactação e
87 formação da blastocle (HARVEY, 2002).

88 No presente estudo, foram realizados dois experimentos. No primeiro
89 experimento, foi testada a eficiência da suplementação dos meios de MIV e CIV com
90 20µM de BME sobre as taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário. No

91 segundo, foi avaliado o efeito da adição da associação de BME e cisteína, também nos
92 meios de MIV e CIV, sobre as taxas de clivagem, desenvolvimento embrionário e de
93 reexpansão após vitrificação.

94

95 **2. MATERIAL E MÉTODOS**

96

97 Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Reprodução Animal da
98 EMBRAPA Clima Temperado, Pelotas - Rio Grande do Sul, no período de novembro de
99 2010 a março de 2011. Todos os reagentes são originários da Sigma-Aldrich[®] Chemical
100 Company (St. Louis, MI, EUA), a menos quando discriminada outra origem.

101

102 **2.1 Primeiro experimento: BME na MIV e CIV de embriões ovinos**

103

104 Para obtenção dos CCO, foram realizadas 6 coletas de ovários de ovelhas púberes
105 em abatedouro local. Os ovários foram mantidos a 30°C em solução salina e antibiótico
106 durante o transporte do frigorífico ao laboratório, onde se procederam a recuperação e
107 seleção dos CCO. Os CCO selecionados para MIV foram divididos em dois tratamentos:
108 BME (n = 328), com meios de MIV e CIV contendo 20 µM de BME; e Controle (n =
109 320), com meios de MIV e CIV sem adição de BME.

110 O meio de MIV foi constituído de TCM 199 acrescido das seguintes substâncias:
111 soro inativado de ovelha em cio (20%); penicilina, 100 UI/ml; estreptomicina, 100
112 µg/ml; FSH, 5µg/ml; LH, 5 µg/ml; estradiol, 1 µg/ml (BERLINGUER *et al.*, 2005). A
113 MIV foi realizada em placas de quatro poços contendo gotas de 400 µl, cobertas com
114 óleo mineral, durante 24 h em estufa a 39°C com atmosfera de 5% CO₂ e umidade
115 saturada. Após a MIV, os CCO foram inseminados com sêmen resfriado diluído (v/v)

116 em tris-gema de ovo (EVANS & MAXWELL, 1987), com concentração de 1×10^9
117 espermatozoides/mL. A seleção dos espermatozoides foi realizada pelo método de
118 seleção de migração ascendente (*Swim up*), em meio Tris (EVANS & MAXWELL,
119 1987) contendo BSA (0,06 g/ml) e piruvato (0,022 g/ml), em tubo cônico contendo 2 ml
120 deste meio. Foram depositados 200 μ L de sêmen no fundo do tubo, incubado por 20 min
121 em estufa a 5% CO₂ em ar a 39°C, em umidade saturada. Após este período, foi retirado
122 500 μ L do sobrenadante, diluído em 500 μ L de meio FIV, composto por SOF (HOLM et
123 al., 1991) sem aminoácidos, e centrifugado a 200 G por 5 min. O meio utilizado para
124 FIV foi o SOF (HOLM et al., 1991) sem aminoácidos e suplementado com 2% de soro
125 inativado de ovelha em cio, 50 μ g/ml estreptomicina e 50 UI/ml penicilina. Após a FIV,
126 os prováveis zigotos foram desnudados e cultivados por 8 dias em meio SOF (HOLM et
127 al., 1991), adicionado de 2,5% de soro fetal bovino (SFB). Todas as etapas envolvidas
128 na técnica (MIV, FIV e CIV) foram realizadas em estufa a 39°C com 5% de CO₂ e
129 umidade saturada.

130 O índice de partenogênese foi avaliado em cada rotina de PIV. Após a MIV, 15
131 oócitos por rotina, em média, foram colocados em poço contendo meio de FIV, porém
132 sem adicionar espermatozoides. No segundo dia pós-inseminação (D2) foram
133 determinadas as taxas de clivagem (clivados/inseminados) e de desenvolvimento
134 embrionário (blastocistos/clivados) no D7 e no D8, além do rendimento global
135 (blastocistos/inseminados). Os embriões foram avaliados e classificados em estágio de
136 blastocisto e blastocisto expandido, de acordo com as normas da Sociedade
137 Internacional de Transferência de Embriões (IETS). Posteriormente, os embriões foram
138 vitrificados em OPS conforme descrito por VAJTA et al. (1998). O parâmetro de
139 viabilidade pós-reaquecimento utilizado foi a taxa de sobrevivência e desenvolvimento
140 embrionário, determinados pela taxa de re-expansão e eclosão.

141 **2.2 Segundo experimento: BME associado à CIS na MIV e CIV de embriões** 142 **ovinos**

143 Neste experimento, foram realizadas 10 rotinas de PIV com ovários de ovelhas
144 púberes. Os ovários foram mantidos a 30°C em solução salina e antibiótico durante o
145 transporte do frigorífico ao laboratório. Os CCO selecionados para MIV foram divididos
146 em dois tratamentos: BME /CIS (n = 729), com meios de MIV e CIV incluindo BME
147 (50µM) e cisteína (600µM); e Controle (n = 676), sem inclusão de antioxidantes nos
148 meios de MIV e CIV. A MIV e a FIV foram realizadas conforme descrito no primeiro
149 experimento. Após a FIV, os prováveis zigotos foram desnudados e cultivados por 8
150 dias em meio SOF (HOLM et al., 1991), com 0,4% BSA, em *bag system* com atmosfera
151 de 3 gases (5%CO₂; 90%N₂ e 5%O₂) (VAJTA et al., 1997), a 39°C.

152 Da mesma forma que no experimento anterior, foram avaliados os índices de
153 partenogênese em cada rotina de PIV, bem como as taxas de clivagem, de
154 desenvolvimento embrionário, rendimento global e de viabilidade pós-reaquecimento.
155 No entanto, as avaliações de desenvolvimento embrionário foram realizadas em D7, em
156 virtude do desenvolvimento mais acelerado dos embriões que foram cultivados sob
157 atmosfera de 3 gases.

158 **2.3 Análise dos dados**

159

160 Tanto no primeiro, como no segundo experimento, as taxas de clivagem, de
161 desenvolvimento embrionário, e de re-expansão pós-reaquecimento foram comparadas
162 entre os tratamentos pelo teste de qui-quadrado, software Statistix® (2008).

163

164 **3 RESULTADOS**

165

166 **3.1 Primeiro experimento: BME na MIV e CIV de embriões ovinos**

167 Os tratamentos Controle e BME apresentaram taxas de clivagem semelhantes
168 ($P>0,05$) (Tabela 1). Porém, a taxa de desenvolvimento embrionário até o estágio de
169 blastocisto e rendimento global foi inferior no tratamento BME ($P<0,001$). Não foi
170 observada divisão partenogénica no presente experimento. A taxa de viabilidade
171 embrionária pós-vitrificação, não diferiu entre os tratamentos Controle e BME (Figura
172 1).

173

174 **3.2 Segundo experimento: BME associado à CIS na MIV e CIV de embriões** 175 **ovinos**

176 Das estruturas cultivadas e analisadas quanto à divisão partenogénica, a
177 clivagem ocorreu em somente 2,1% no tratamento Controle (2/94) e 1,9% no tratamento
178 BME/CIS (2/101). A suplementação do meio de MIV e CIV com 50 μ M de BME e
179 600 μ M de CIS não apresentou efeito ($P > 0,05$) sobre as taxas de clivagem, de
180 desenvolvimento embrionário (Tabela 2) e de viabilidade de embriões de ovinos
181 vitrificados (Figura 2).

182

183 **4 DISCUSSÃO**

184

185 A concentração de 20 μ M de BME, quando adicionada nas duas etapas de MIV e
186 CIV no primeiro experimento, não influenciou as taxas de clivagem, porém reduziu a
187 taxa de desenvolvimento embrionário. Na concentração de 50 μ M, o BME apresenta a
188 ação como precursor de GSH intracelular em oócitos ovinos, porém sem efeito sobre o
189 desenvolvimento embrionário (DE MATOS et al., 2002). Portanto, a escolha de uma
190 concentração menor de BME seria justificada, em especial porque, em concentrações

191 maiores que 50 μM , o BME teria efeito tóxico, podendo inibir e/ou desnaturar proteínas
192 (TAKAHASHI et al., 1993; MORI et al., 2006). Porém, a desnaturação de estruturas
193 proteicas e enzimáticas também pode ter ocorrido no primeiro experimento, pois o uso
194 de 20 μM BME em ambas as etapas de MIV e CIV pode ter interferido em rotas
195 oxidativas importantes (KOWALTOWSKI et al., 2009), uma vez que o BME não foi
196 associado à outra substância antioxidante como a CIS, cistina ou cisteína (DE
197 MATOS et al., 1997). Quando usado isoladamente, uma das funções do BME seria a
198 indução da síntese de GSH intracelular por meio do conjugado BME-cisteína, o que
199 facilita a entrada da CIS na célula (ISHII et al., 1981; TAKAHASHI et al., 1993; DE
200 MATOS et al., 1995; DE MATOS et al., 1997). A GSH é um potente antioxidante
201 intracelular, conferindo proteção contra danos oxidativos (LUBERDA, 2005) e sua
202 síntese depende da CIS presente no meio. No entanto, como a concentração de CIS no
203 meio TCM 199 usado na PIV de embriões, no primeiro experimento, é mais baixa do
204 que a concentração de cistina (cisteína 0,6 μM e cistina 83,2 μM), e como a cistina na
205 forma de cisteína oxidada não consegue entrar na célula, há a necessidade do uso de
206 BME como mediador (TAKAHASHI et al., 1993).

207 O desenvolvimento embrionário observado no primeiro experimento pode também
208 ter sido influenciado pela alta tensão de oxigênio (20% O_2 e 5% CO_2) utilizada na estufa
209 de incubação. Danos oxidativos têm sido observados com o uso de alta tensão de
210 oxigênio no ambiente de cultivo, ocasionando maior produção de radicais livres,
211 prejudiciais ao desenvolvimento embrionário (THOMPSON et al., 1990), o que justifica
212 o uso de antioxidantes no cultivo *in vitro*, tais como superóxido dismutase (SOD),
213 tioredoxina (TAKAHASHI et al., 1994), ou GSH.

214 Em função dos resultados insatisfatórios do primeiro experimento, no segundo
215 experimento foram testados o BME (50 μM) e a CIS (600 μM) nas etapas de MIV e CIV,

216 com a intenção de incrementar as taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário. A
217 escolha da concentração de 50 μ M de BME foi baseada no fato de que, quando associado
218 com a CIS, o BME facilita a absorção da CIS através do transporte da cistina (CIS
219 oxidada), melhorando a síntese de GSH (ISCHII et al., 1981). Uma vez que há um
220 considerável consumo de BME neste processo, maiores concentrações de BME seriam
221 necessárias para que este possa desempenhar sua função antioxidante. A adição desta
222 associação de antioxidantes na MIV promove melhora no desenvolvimento embrionário
223 até D7 em ovinos (BAI et al., 2008) e bovinos (DE MATOS et al., 2000). No entanto,
224 as taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário não foram afetadas pelo uso
225 destes antioxidantes no segundo experimento.

226 Ainda que a tensão de oxigênio tenha sido reduzida no segundo experimento (5%
227 CO₂, 5% O₂ e 90% N₂) (TERVIT et al., 1972) com a utilização do sistema de bag
228 (VAJTA et al., 1997), esta redução não beneficiou as taxas de desenvolvimento
229 embrionário. Desta forma, estes resultados indicam que não houve prejuízo relacionado
230 ao uso dos antioxidantes testados, porém estes somente poderão ser incorporados nas
231 rotinas deste processo, após a determinação das concentrações mais efetivas. Também é
232 relevante determinar em qual etapa da PIV de embriões, o uso destes antioxidantes seria
233 mais relevante (na MIV ou no CIV), já que, no presente estudo, estes foram utilizados
234 em ambas as etapas.

235

236 **5 CONCLUSÕES**

237

238 A concentração de 20 μ M de BME nas etapas de MIV e CIV reduziu a taxa de
239 desenvolvimento embrionário. A adição de BME e CIS, nas concentrações de 50 μ M e

240 600 μ M respectivamente, não trouxe benefício para as taxas de produção embrionária *in*
241 *vitro* em ovinos.

242

243 Aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pelotas, sob o
244 número 5541.

245

246 **Agradecimentos**

247 EMBRAPA Clima Temperado

248 Frigorífico Marfrig

249

250

251 **6 BIBLIOGRAFIA**

252

253 BAI, J. et al. Effect of 2-mercaptoethanol and cysteine supplementation during *in vitro*
254 maturation on the developmental competence of oocytes from hormone-stimulated
255 lambs. **Theriogenology**, v.70, p.758-764, 2008. Disponível em:
256 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.053>>. Acessado em: 05 fev. 2013.
257 DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.04.053.

258

259 BERLINGUER, F. et al. *In vivo* and *in vitro* fertilizing capacity of cryopreserved
260 European mouflon (*Ovis gmelini musimon*) spermatozoa used to restore genetically rare
261 and isolated populations. **Theriogenology**, v.63, p.902-911, 2005. Disponível em: <
262 <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.05.006>>. Acessado em 05 fev. 2013.
263 DOI: 10.1016/j.theriogenology.2004.05.006.

264

265 CHOE, C. et al. Synergistic effects of glutathione and b-mercaptoethanol treatment
266 during *in vitro* maturation of porcine oocytes on early embryonic development in a
267 culture system supplemented with L-cystine. **Journal of Reproduction and**
268 **Development**, v.56, n.6, p.575-582, 2010. Disponível em: <
269 <http://dx.doi.org/10.1262/jrd.09-214H>>. Acessado em: 05 fev. 2013. DOI:
270 10.1262/jrd.09-214H.

271

272 DE MATOS, D., FURNUS, C. The importance of having high glutathione (GSH) level
273 after bovine *in vitro* maturation on embryo development effect of β -mercaptoethanol
274 cysteine and cystine. **Theriogenology**, v. 53, p.761-771, 2000. Disponível em: <

275 [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00278-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00278-2)>. Acessado em: 05 fev. 2013. DOI:
276 10.1016/S0093-691X(99)00278-2.

277

278 DE MATOS, D.G. et al. Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation and
279 embryo culture: a useful tool for increasing the efficiency of bovine *in vitro* embryo
280 production. **Molecular Reproduction and Development**, v.62, p.203-209, 2002.
281 Disponível em:< <http://dx.doi.org/10.1002/mrd.10087>>. Acessado em: 05 fev. 2013.
282 DOI: 10.1002/mrd.10087.

283

284 DE MATOS, D. et al. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental
285 capacity of bovine oocyte matured *in vitro*. **Molecular Reproduction and**
286 **Development**, v. 42, p.432-436, 1995. Disponível em:<
287 <http://dx.doi.org/10.1002/mrd.1080420409>>. Acessado em: 05 fev. 2013. DOI:
288 10.1002/mrd.1080420409.

289

290 DE MATOS, D. et al. Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured and its
291 effect on embryo development and freezability. **Molecular Reproduction and**
292 **Development**, v.45, p.451-457, 1996. Disponível em:
293 <[http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199612\)45:4<451::AID-MRD7>3.0.CO;2-](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199612)45:4<451::AID-MRD7>3.0.CO;2-Q)
294 [Q](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199612)45:4<451::AID-MRD7>3.0.CO;2-Q)> Acessado em: 05 fev. 2013. DOI: 10.1002/(SICI)1098-
295 2795(199612)45:4<451::AID-MRD7>3.0.CO;2-Q.

296

297 DE MATOS, D.G. et al. Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of bovine
298 oocytes: role of cumulus cells. **Biology of Reproduction**, v.57, p.1420-1425, 1997.

299 Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod57.6.1420>>. Acessado em: 05 fev.
300 2013. DOI: 10.1095/biolreprod57.6.1420.

301 EVANS, G. & MAXWELL, W.M.C. **Salamon's Artificial Insemination of sheep and**
302 **goats**. Editora Butterworths, 1987. 194p.

303 GUERIN, P. et al. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the
304 pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction**, v.7, p.175-189,
305 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/humupd/7.2.175>>. Acessado em: 05
306 fev. 2013. DOI: 10.1093/humupd/7.2.175.

307

308 HARVEY, A.J. Redox regulation of early development. **Reproduction**, v.123, p.479-
309 486, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1530/rep.0.1230479>>. Acessado em: 05
310 fev. 2013. DOI: 10.1530/rep.0.1230479.

311

312 HOLM, P. et al. *In vitro* production of sheep blastocysts from IVM-oocytes using frozen
313 semen and oviduct epithelial cell co-culture for IVF. **Theriogenology**, v. 35, p. 214,
314 1991. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X\(91\)90190-O](http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X(91)90190-O)>. Acessado
315 em: 05 fev. 2013. DOI: 10.1016/0093-691X(91)90190-O.

316

317 HOSSEINI, S. O. et al. Effect of culture condition and cell-permeable superoxide
318 dismutase on levels of reactive oxygen species (ROS) production in “*in vitro*” produced
319 sheep embryos. **Small Ruminant Research**,v. 97,p.88-93, 2011. Disponível em: <
320 <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.02.010>>. Acessado em: 05 fev. 2013. DOI:
321 10.1016/j.smallrumres.2011.02.010.

322

323 ISHII, T. et al. Mechanism of Growth Stimulation of L1210 Cells by 2-Mercaptoethanol
324 *in vitro*: Role of the mixed disulfide of 2-mercaptoethanol and cysteine. **The Journal of**
325 **Biologic Chemistry**, v 256, N. 23, p. 12387-12392, 1981.

326

327 LIVINGSTON, T. et al. Glutathione content and antioxidant enzyme expression of *in*
328 *vivo* matured sheep oocytes. **Animal Reproduction Science**, v.116, p.265-273, 2009.

329 Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.02.004>>. Acessado em:
330 05 fev. 2013. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2009.02.004.

331

332 LUBERDA Z. The role of glutathione in mammalian gametes. **Reproduction of**
333 **Biology**, v.5, p.5-17, 2005. Disponível em:<

334 [http://repbiol.pan.olsztyn.pl/2010/06/11/the-role-of-glutathione-in-mammalian-](http://repbiol.pan.olsztyn.pl/2010/06/11/the-role-of-glutathione-in-mammalian-gametes/)
335 [gametes/](http://repbiol.pan.olsztyn.pl/2010/06/11/the-role-of-glutathione-in-mammalian-gametes/)>.

336

337 MORI, M. et al. Effects of b-mercaptoethanol and cycloheximide on survival and DNA
338 damage of bovine embryos stored at 4°C for 72 h. **Theriogenology** v.65, p.1322-1332,
339 2006. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.07.018>>.

340 Acessado em: 05 fev. 2013. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2005.07.018.

341

342 STATISTIX[®], STATISTIX 9 ANALYTICAL SOFTWARE. TALLAHASSEE, FL,
343 USA. 2008.

344

345 TAKAHASHI, M. et al. Promoting effect of b-mercaptoethanol on *in vitro* development
346 under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos. **Biology of Reproduction**,

347 v.6, p.562-567, 2002. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod66.3.562>>.

348 Acessado em: 05 fev. 2013. DOI: 10.1095/biolreprod66.3.562.

349

350 TAKAHASHI, M. et al. Effect of thiol compounds on *in vitro* development and
351 intracellular glutathione content of bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v.49,
352 p.228-232, 1993. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod49.2.228>>.

353 Acessado em: 05 fev. 2013. DOI: 10.1095/biolreprod49.2.228.

354

355 TERVIT, H.R.; WHITTINGHAM, D.G. & ROWSON, L.E.A. Successful culture *in*
356 *vitro* of sheep and cattle ova. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 30, p. 493-497,
357 1972. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/content/30/3/493.long>>

358 Acessado em: 20 de março de 2013. DOI: doi: 10.1530/jrf.0.0300493.

359

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

363

364 THOMPSON, J.G. *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos
365 – a decade of achievement. **Animal Reproduction Science**, v.60, p.263-275, 2000.
366 Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00096-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00096-8)>. Acessado em: 05

367 fev. 2013. DOI: 10.1016/S0378-4320(00)00096-8.

368

369 VAJTA, G. et al. The submarine incubation system a new tool for *in vitro* embryo
370 culture: a technique report. **Theriogenology**, v.48, p.1379-1395, 1997. Disponível em: <

371 [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00379-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00379-8)>. Acessado em: 05 fev. 2013. DOI:
372 10.1016/S0093-691X(97)00379-8.

373

374 VAJTA, G. et al. Open pulled straws (OPS) vitrification: a new way to reduce
375 cryoinjuries of bovine ova embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.51,
376 p.53-58, 1998. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-
377 2795\(199809\)51:1<53::AID-MRD6>3.0.CO;2-V](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199809)51:1<53::AID-MRD6>3.0.CO;2-V)>. Acessado em: 05 fev. 2013. DOI:
378 10.1002/(SICI)1098-2795(199809)51:1<53::AID-MRD6>3.0.CO;2-V.

379

380

381 Tabela 1: Taxas de clivagem, desenvolvimento embrionário até o oitavo dia após a
382 inseminação (D8) e rendimento global de acordo com a inclusão de β -mercaptoetanol
383 (20 μ M) nos meios de maturação e cultivo *in vitro*

Tratamento	Clivagem (%)	D8 (%)	Rendimento global (%)
Controle	320/224 (70,0)	38/224 (16,9) a	38/320 (11,4) a
β -mercaptoetanol	328/229 (69,8)	12/229 (5,2) b	12/328 (3,6) b

384 a,b Taxas com expoentes diferentes diferem por pelo menos $P < 0,05$

385

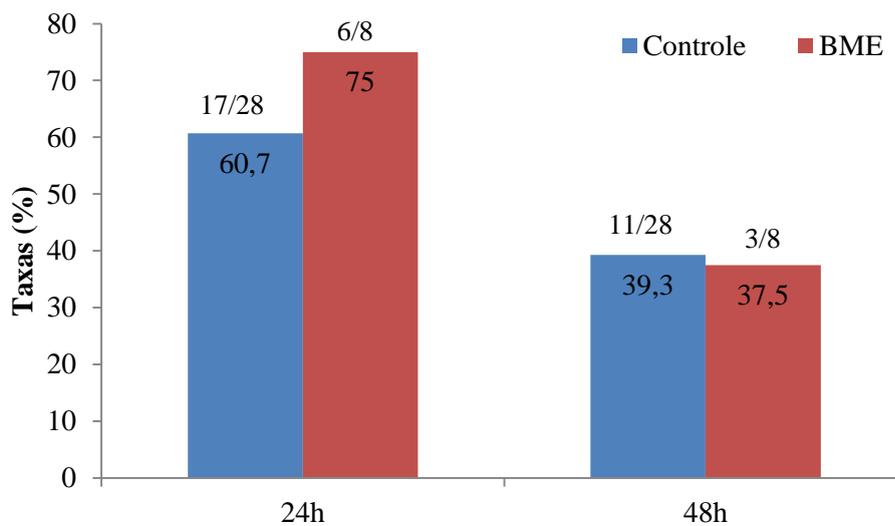
386 Tabela 2: Taxas de clivagem, desenvolvimento até o sétimo dia após a inseminação (D7)
387 e rendimento global de acordo com a inclusão de β -mercaptoetanol (50 μ M) e cisteína
388 (600 μ M) nos meios de maturação e cultivo *in vitro*.

Tratamento	Clivagem (%)	D7 (%)	Rendimento global (%)
Controle	434/720 (60,3)	146/434 (33,6)	146/720 (20,2)
BME/CIS	435/676 (64,3)	161/439 (36,6)	161/676 (23,8)

389 Não houve diferença entre os tratamentos ($P > 0,05$)

390

391



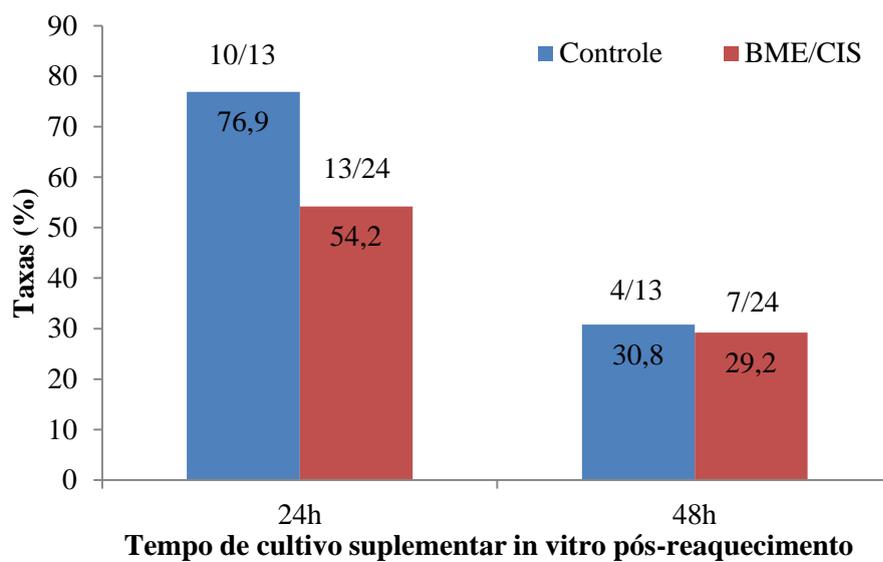
Tempo de cultivo suplementar *in vitro* pós-reaquecimento

392

393 Figura 1: Taxa de re-expansão (24 h) e eclosão (48 h) por tratamento, durante cultivo
394 suplementar *in vitro* após reaquecimento de embriões vitrificados. Controle: sem
395 antioxidantes. BME: inclusão de 20 μ M de BME nos meios de MIV e CIV.

396

397



398

399 Figura 2: Taxa de re-expansão (24 h) e eclosão (48 h) por tratamento, durante cultivo
400 suplementar *in vitro* após reaquecimento de embriões vitrificados. Controle: sem adição
401 de antioxidantes. BME/CIS: inclusão de 50 μ M de BME e 600 μ M de CIS nos meios de
402 MIV e CIV.

403

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As considerações mais importantes em relação à associação dos antioxidantes usados no congelamento de sêmen ovino e na PIV, é que esta associação de BME e CIS não promoveu melhora dos tratamentos em que foram adicionados, em ambos os artigos, ainda que em concentrações diferentes.

Nas concentrações utilizadas dos antioxidantes BME e CIS, associados ou não, no diluente de congelamento para ovinos não promoveram benefícios aos parâmetros analisados pós-descongelamento, porém não foram prejudiciais ao sêmen pós-descongelamento. Isto indica que outras concentrações podem ser testadas, com intuito de incrementar tanto a motilidade quanto os demais parâmetros de qualidade seminal pós-descongelamento.

Já em relação à suplementação dos meios de MIV e CIV de embriões ovinos com 20 μ M de BME indica que seu uso isolado nas duas etapas não proporciona melhora nas taxas de desenvolvimento embrionário e rendimento global, provavelmente por interferir em rotas oxidativas importantes para o desenvolvimento dos embriões. No entanto, quando utilizada à associação de BME e CIS, nas mesmas etapas de MIV e CIV, não trouxe prejuízo às taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário, sugerindo que a associação destes antioxidantes pode ser provada com outras concentrações e outro modelo experimental que demonstre a ação dos mesmos somente na MIV, somente na CIV, na MIV e CIV confrontados com um tratamento controle.

Além disso, será importante a utilização de testes moleculares e bioquímicos que demonstrem a expressão para enzimas como a glutatona, potente antioxidante intracelular. A mensuração de tais enzimas nos meios de

MIV e CIV poderá comprovar a importância dos antioxidantes nas diferentes fases da PIV.

Quanto às taxas de re-expansão pós-vitrificação, mesmo que não tenha havido diferenças entre os tratamentos, em nenhum dos experimentos, o número reduzido de embriões vitrificados não permite maiores conclusões. Contudo, é de interesse a informação acerca da viabilidade de embriões pós vitrificação, sendo assim outro campo que está sendo explorado e precisa de suporte científico no que se refere a ovinos.

5 REFERÊNCIAS GERAIS

AMADO, L.L.; GARCIA, M.L.; RAMOS, P.B.; FREITAS, R.F.; ZAFALON, B.; FERREIRA, J.L.R.; YUNES, J.S.; MONSERRAT, J.M. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. **Science of the Total Environment**, v.407, p. 2115 - 2123, 2009.

ARAUJO, A.R., IANELLA, P., MORAES, J.C.F., SOUZA, C.J.H., PAIVA, S.R. Manejo de diversidade genética em um núcleo de conservação da raça ovina Crioula Lanada (Ovis Aries), Brasil. **VII Simpósio de recursos genéticos para América Latina (SIRGEALC)**, Pucón, Chile, p. 221-222, 2009.

BAI, J.; HOU, J.; GUAN, H.; YAN, F.; CUI, X.; LIU, L.; WANG, S.; AN X. Effect of 2-mercaptoethanol and cysteine supplementation during *in vitro* maturation on the developmental competence of oocytes from hormone-stimulated lambs. **Theriogenology**, v. 70, p. 758–764, 2008.

BERLINGUER, F.; LEONI, G.G.; BOGLIOLO, L.; BEBBERE, D.; SUCCU, S.; ROSATI, I.; LEDDA, S.; NAITANA, S. *In vivo* and *in vitro* fertilizing capacity of cryopreserved European mouflon (*Ovis gmelini musimon*) spermatozoa used to restore genetically rare and isolated populations. **Theriogenology**, v. 63, p. 902-911, 2005.

BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, L S.; GAGNON, I C.; SIRARD, M.A. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology** v. 56, p. 275-286, 2001.

BRICARELLO, P. A.; GENNARI, S. M.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; VAZ, C. M. S. L.; GONÇALVES DE GONÇALVES, I.; ECHEVARRIA, F.A.M. Worm burden and immunological responses in Corriedale and Crioula Lanada sheep following natural infection with *Haemonchus contortus*. **Small Ruminant Research**, v. 51, p. 75-83, 2004.

BUCAK, M.N.; ATESSAHIN,A.; VARISLI,O.; YÜCE,A.; TEKIN, N.; AKÇAY,A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen. Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. **Theriogenology**, v.67, p.1060-1067, 2007.

BUCAK, M. N., ATESSAHIN, A., YUCE, A. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process. **Small Ruminant Research**, v.75, p.128–134, 2008.

CHATTERJEE, S. e GAGNON, C. production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. **Molecular reproduction and development**, v.59, p.45-458, 2001.

CHOE, C.; SHIN,Y.; KIM,E.; CHO, S.; KIM,H.; CHOI,S.; HAN,M.; HAN,J.; SON, D.; KANG,D. Synergistic effects of glutathione and b-mercaptoethanol treatment during *in vitro* maturation of porcine oocytes on early embryonic development in a culture system supplemented with L-cystine. **Journal of Reproduction and Development**, v.56, n.6, p.575-582, 2010.

COGNIÉ, Y.; BARIL, G.; POULIN, N.; MERMILLOD, P. Current status of embryo technologies in sheep and goat. **Theriogenology**, v.59, p.171-188, 2003.

DE MATOS, D., FURNUS, C., MOSES, D., BALDESARRE, H. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 42, p.432-436, 1995.

DE MATOS, D., FURNUS, C., MOSES, D., MATKOVIC, M., MARTINEZ, A. G. Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured and its effect on embryo development and freezability. **Molecular Reproduction and Development**, v.45, p.451-457, 1996.

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

DE MATOS, D., FURNUS, C. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine *in vitro* maturation on embryo development effect of β -mercaptoethanol cysteine and cystine. **Theriogenology**, v. 53, p.761-771, 2000.

DE MATOS, D.G.; HERRERA, C.; CORTVRINDT, R.; SMITZ, J.; VAN SOOM, A., NOGUEIRA, D. e 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. **Molecular reproduction and development**, v.62, p.203–209, 2002.

DE MATOS, D.G.; GASPARRINI, B.; PASQUALINI, S.R.; THOMPSON, J.G. Effect of glutathione synthesis stimulation during *in vitro* maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. **Theriogenology**, v.57, p.1443-1451, 2002.

EVANS, G. & MAXWELL, W.M.C. **Salamon's Artificial Insemination of sheep and goats**. Editora Butterworths, 1987. 194p.

EVENSON, D.P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M.R. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v .30, p. 279-280, 1982.

FONSECA, J.F.; SOUZA, J.M.G.; CAMARGO, L.S.A. Produção de oócitos e embriões de pequenos ruminantes: passado, presente e futuro. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.38, p.337-369, 2010.

FURNUS, C.C., D.G. DE MATOS , S. PICCO , P. PERAL GARCIA,A.M. INDA, G. MATTIOLI F, A.L. ERRECALDE Metabolic requirements associated with GSH synthesis during *in vitro* maturation of cattle oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 109, p. 88–99, 2008.

FUNAHASHI, H. Effect of beta-mercaptoethanol during *in vitro* fertilization procedures on sperm penetration into porcine oocytes and the early development *in vitro*. **Reproduction**,v.130,p.889–898, 2005.

GASPARRINI, B.; SAYOUD, H.; NEGLIA, G.; DE MATOS, D. G.; DONNAY, I.; ZICARELLI, L. Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effects of cysteamine on embryo development. **Theriogenology**, v. 60, p.943–952, 2003.

GUERIN, P., MOUTASSAM, S.E., MENEZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction**, v.7, p.175-189, 2001.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p. 343-352, 1990.

HARVEY, A.J. Redox regulation of early development. **Reproduction**, v.123, p.479-486, 2002.

HOLM, P.; IRVINE, B.; ARMSTRONG, D.T.; SEAMARK, R.F. *In vitro* production of sheep blastocysts from IVM-oocytes using frozen semen and oviduct epithelial cell co-culture for IVF. **Theriogenology**, v. 35, p. 214, 1991.

HOSSEINI, S. O.; AGHAEI, F.; HOSSEINI, S.M.; HAJIANA, M.; FOROUZANFAR, M.; NOORBAKHSHNIA, M.; GOURABI, H.; SHAHVERDIE,

A.H., DIZAJ, A. V. T.; NASR-ESFAHANI, M.H. Effect of culture condition and cell-permeable superoxide dismutase on levels of reactive oxygen species (ROS) production in “*in vitro*” produced sheep embryos. **Small Ruminant Research**, v. 97, p.88–93, 2011.

ISHII, T., BANNAIA, S., SUGITA, Y. Mechanism of Growth Stimulation of L1210 Cells by 2-Mercaptoethanol *in vitro*: Role of the mixed disulfide of 2-mercaptoethanol and cysteine. **The journal of biologic chemistry**, v 256, N. 23, p. 12387-12392, 1981.

KOWALTOWSKI, A.J., SOUZA-PINTO, N.C., CASTILHO, R.F., VERCESI, A.E. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology & Medicine**, v.47, p.333-343, 2009.

LIVINGSTON, T.; RICH, K.; MACKENZIE, S.; GODKIN, J.D. Glutathione content and antioxidant enzyme expression of *in vivo* matured sheep oocytes. **Animal Reproduction Science**, v.116, p.265-273, 2009.

LUBERDA, Z. The role of glutathione in mammalian gametes. **Reproductive Biology**, v.5, p.5-17, 2005.

MAIA, M.S. **Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de lauril sulfato de sódio (OEP), trolox-c e catalase.** Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). 2006. 165f. Faculdade de Medicina Veterinária e Ciência Animal - UNESP, Botucatu.

MAIA, M.S.; BICUDO, S.D.; SICHERLE, C.C.; RODELLO, L.; GALLEGO, I.C.S. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v. 122, Issues 1-2, p.118-123, 2010.

Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 1998. 49p.

MARTÍNEZ, A.G.; VALCÁRCEL, A., FURNUS, C.C.; DE MATOS, D.G.; IORIO, G.; DE LAS HERAS, M.A. Cryopreservation of *in vitro*-produced ovine embryos. **Small Ruminant Research**, v.63, p.288-296, 2006.

MYHRE, O.; FONNUM, F. The effect of aliphatic, naphthenic, and aromatic hydrocarbons on production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in rat brain synaptosome fraction: the involvement of calcium, nitric oxide synthase, mitochondria, and phospholipase A. **Biochemical Pharmacology**, n.62, p.119–128 2001.

MORI, M.; OTOI, T.; WONGSRIKEAO, P.; AGUNG, B.; NAGAI, T. Effects of b-mercaptoethanol and cycloheximide on survival and DNA damage of bovine embryos stored at 4°C for 72 h. **Theriogenology**, v.65, p.1322-1332, 2006.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Lehninger Principles of Biochemistry. 4ª edição. Editora Freeman, 2005, p.343.

NIKI, E. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. **Free Radical Biology & Medicine**, v.47, p.469-484, 2009.

PERIS, S.I., BILODEAU, J.F., DUFOUR, M., BAILEY, J.L. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, p.878–892, 2007.

PURSEL, V.G., WALL, R.J., REXROAD, C.E., HAMMER, R.E., BRINSTER, R.L. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. **Theriogenology**, v.24, p.687- 691, 1985.

ROMÃO, R.; MARQUES, C.C.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I.; BARBAS, J.P.; HORTA, A.E.M.; CAROLINO, N.; BETTENCOURT, E.; PLANCHA, C.; RODRIGUES, P., PEREIRA, R.M. Evaluation of two methods of *in vitro* production of ovine embryos using fresh or cryopreserved semen. **Small Ruminant Research**, v.110, p.36-41, 2013.

SALAMON, S., MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.77–111, 2000.

SALEHI, R.; H. KOHRAMA; TOWHIDIA, A.; KERMANI MOAKHARA, H.; HONARVAR, M. Follicular development and ovulation rate following different superovulatory treatments in Chall ewes. **Small Ruminant Research**, v. 93, p. 213–217, 2010.

SALEM, M.H., ABDEL-KEREIM, M.A., SELIM A.R. E PURSEL, V.G.. Effect of incubation conditions, inhibitors, 2-mercaptoethanol and testosterone on rna synthesis in ram spermatozoa. **Theriogenology**, v.30, p.339-347,1988.

SARIÖZKAN, S.; BUCAK, M. N.; TUNCER, P. B.; ULUTAS, P.A.; BILGEN, A. The influence of cysteine and taurine on microscopic–oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. **Cryobiology**, v. 58, p.134–138, 2009.

SICHERLE,,C.C.; MAIA,M.S.; BICUDO,S.D.; RODELLO,L.; AZEVEDO, H.C. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen supplemented with catalase or Trolox. **Small Ruminant Research**,v. 95, p.144–149, 2011.

STATISTIX[®], STATISTIX 9 ANALYTICAL SOFTWARE. TALLAHASSEE, FL, USA. 2008.

TABUCHI, T., SHIDARO, O., HARAYAMA, H. A 32 kDA tyrosine phosphorylated protein shows a protease dependent increase in dead boar spermatozoa. *Journal of Reproduction and Development*, v.54, p.502-507, 2008.

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. **Biology of Reproduction**, v.49, p.228-232, 1993.

TAKAHASHI, M.; NAGAI, T.; OKAMURA, N.; TAKAHASHI, H.; OKANO, A. Promoting effect of β -mercaptoethanol on *in vitro* development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v.6, p.562-567, 2002.

TALEVI, R.; ZAGAMI, M.; CASTALDO, M.; GUALTIERI, R. Redox regulation of sperm surface thiols modulates adhesion to the fallopian tube epithelium. **Biology of reproduction** v.76, p.728–735, 2007.

TERVIT, H.R.; WHITTINGHAM, D.G. & ROWSON, L.E.A. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 30, p. 493-497, 1972.

THOMPSON, J.G.E; SIMPSON, 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. **Journal Reproduction Fertility**, v.89, p.573-578, 1990.

THOMPSON, J.G. *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos – a decade of achievement. **Animal Reproduction Science**, v.60, p.263-275, 2000.

VAJTA, G.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESSEN, H. The submarine incubation system a new tool for *in vitro* embryo culture: a technique report. **Theriogenology**, v.48, p.1379-1395, 1997.

VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P.J.; JACOBSEN, H.; GREVE, T.; CALLESSEN, H. Open pulled straws (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.51, p. 53-58, 1998.

VAZ, C.M.S.L. Situação atual da preservação e avaliação de ovinos crioulos lanados no Brasil. In: 30^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Anais...Rio de Janeiro. p. 207-215, 1993.

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

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60–61, p.481–492, 2000.

YAMAGUCHI, S.; FUNAHASHI, H. Effect of the addition of beta-mercaptoethanol to a thawing solution supplemented with caffeine on the function of frozen-thawed boar sperm and on the fertility of sows after artificial insemination. **Theriogenology**, v.77, p.926–932, 2012.