

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**EFEITO DO β -MERCAPTOETANOL NA CRIOTOLERÂNCIA À
VITRIFICAÇÃO EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO***

KARINE DE MATTOS

Médica Veterinária/UNIPAMPA

Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção do grau de
mestre em Zootecnia

Área de concentração: Melhoramento e Genética Animal

Porto Alegre (RS), Brasil
Março, 2019.

CIP - Catalogação na Publicação

Mattos, Karine
EFEITO DO β -MERCAPTOETANOL NA CRIOTOLERÂNCIA À
VITRIFICAÇÃO EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN VITRO /
Karine Mattos. -- 2019.
47 f.
Orientador: Marcelo Bertolini.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. estresse oxidativo. 2. criosobrevivência. 3.
criopreservação. 4. embriões bovinos. I. Bertolini,
Marcelo, orient. II. Título.

Karine Mattos
Karine de Mattos
Médica Veterinária

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM ZOOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 29/03/2019
Pela Banca Examinadora

Marcelo Bertolini
MARCELO BERTOLINI
PPG Zootecnia UFRGS
Orientador

Homologado em: 22/05/2019
Por

Daniilo Pedro Streit Jr.
DANILO PEDRO STREIT JR.
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia

Daniela Dos Santos Erum
Daniela Dos Santos Erum
UNIPAMPA

Paula Rodriguez Villamil
Paula Rodriguez Villamil
Recombinetics

Andrea Giannotta Galuppo
Andrea Giannotta Galuppo
UFRGS

Carlos Alberto Bissani
CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de Agronomia

Dedico essa conquista a minha mãe Eliani, que esteve presente em todos os momentos dessa caminhada, sendo meu maior exemplo e motivação para chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Eliani, uma mulher guerreira, forte e com um coração gigante, agradeço por tudo! És o pilar da minha vida e sem teu apoio, força, amor e incentivo eu não haveria chegado até aqui.

Ao meu pai Flavio, pelo suporte e incentivo e por estar presente mesmo à distância.

A minha família, especialmente meus nonos, meus segundos pais. Obrigada de coração por serem essas pessoas maravilhosas, por nunca me deixarem faltar amor, incentivo e força. Obrigada pela compressão, apoio e por estarem ao lado da minha mãe nos momentos que estive distante.

A minha prima e amiga que as vezes é mãe e irmã também, Josi. Obrigada por toda a força, conselhos, incentivos e apoio nestes dois anos. És parte fundamental desta conquista. Agradeço por me dar um primo de coração, o Helison, que também foi muito importante nessa etapa. Obrigada pelo apoio e suporte, pois sem vocês, meu intercâmbio não teria sido possível.

Ao meu orientador Marcelo, toda minha admiração à pessoa e profissional extraordinário que és. Agradeço primeiramente a oportunidade de fazer parte do seu grupo. Sou grata pelos ensinamentos, confiança, apoio, incentivo e paciência nessa caminhada.

Aos meus colegas e amigos Elvis, Luis, Camilo, Gabriella, Karine C., Bruna, Juliana, Pedro, Paula e Felipe, que foram mais que companheiros de laboratório, foram minha família nestes dois anos. Obrigada por serem estes seres humanos tão especiais e com um coração tão enorme. Certamente essa estrada não teria o mesmo brilho sem vocês.

A minha eterna tutora e amiga, Daniela, agradeço pela amizade, companheirismo e incentivo nesses dois anos. Fostes minha orientadora na graduação e participastes de muitas etapas do meu mestrado. Obrigada pelo incentivo, suporte, por me preparar para esse desafio e por estar sempre à disposição.

Agradeço ao Dr. Lawrence pela oportunidade da realização do período sanduiche em seu laboratório. Essa experiência foi essencial para meu mestrado, me proporcionando uma visão mais clara sobre a ciência no mundo e sobre os próximos passos a seguir. Agradeço também aos colegas e amigos de Saint-Hyacinthe e da Université de Montreal, Elena Hidalgo, Jean-Philippe, Esdras, Adriana, Jacinthe Therrien, Luis Aguila e Mareva pelo suporte, amizade e companheirismo nesses 5 meses gelados.

Por fim, ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pela oportunidade a apoio, a UFRGS que me oportunizou uma educação pública e de qualidade e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos de Mestrado.

Muito Obrigada!

EFEITO DO β -MERCAPTOETANOL NA CRIOTOLERÂNCIA À VITRIFICAÇÃO EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*¹

Autor: Karine de Mattos

Orientador: Dr. Marcelo Bertolini

RESUMO – O controle do processo oxidativo nos sistemas de produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos através do uso de aditivos pode ser uma abordagem alternativa para melhorar a criotolerância embrionária. O objetivo deste estudo foi verificar o efeito do β -mercaptoetanol (β ME) na criotolerância de embriões bovinos PIV. Foram realizados dois experimentos. No Experimento I, embriões de PIV foram vitrificados no Dia 7 de desenvolvimento, e após o aquecimento, foram cultivados *in vitro* em meio contendo 0, 50 ou 100 μ M de β ME por 72 h, quando as taxas de eclosão foram avaliadas. A melhor concentração de β ME encontrada no Experimento I foi utilizada para o Experimento II. No Experimento II, após a MIV-FIV, os presumíveis zigotos foram cultivados *in vitro* na presença (tratamento CIV) ou ausência de β ME, durante 7 dias. Os blastocistos de excelente e boa qualidade foram vitrificados. Após o aquecimento, os embriões foram alocados aleatoriamente em dois subgrupos e cultivados por 72 h adicionais até o estágio de blastocisto eclodido em meio SOF suplementado (tratamento CPA) ou não com β ME. Os grupos experimentais foram compostos da seguinte forma: G1 (meio isento de β ME durante CIV e CPA); G2 (β ME apenas durante a CPA); G3 (β ME apenas durante CIV); G4 (β ME durante CIV e CPA). No Experimento I, verificou-se que a concentração de 100 μ M de β ME foi mais eficiente, produzindo maior taxa de eclosão. No Experimento II constatou-se que o uso de β ME durante o CIV não afetou as taxas de clivagem (G1, 80,2% vs. G3, 81,1%), mas afetou negativamente o desenvolvimento ao estágio de blastocisto (G1, 43,8% vs. G3, 28,0%). Após a vitrificação, entretanto, a suplementação de β ME durante o CIV, com ou sem adição de β ME no CPA, melhorou a taxa de reexpansão (CIV 84,0% e CIV/CPA 87,5% vs. controle 71,0%). O β ME no CPA melhorou as taxas de eclosão (G2, 58,1% e G4, 63,8%) em comparação com os grupos sem o aditivo (G1, 36,6% e G3, 42,0%). Além disso, a presença de β ME durante o CIV ou CPA, ou mesmo durante ambos os períodos de cultivo, aumentou o número total de células em blastocistos eclodidos de embriões vitrificados. Em conclusão, a adição de β ME durante o período de CIV não afetou a clivagem, mas reduziu o desenvolvimento até blastocisto. Apesar disto, a suplementação de β ME durante o período de CIV aumentou a criotolerância dos blastocistos, observada pelo aumento na taxa de reexpansão, enquanto a suplementação de β ME durante o período CPA também melhorou a sobrevivência dos embriões após a vitrificação, manifestada por maiores taxas de eclosão, número total de células em blastocistos eclodidos.

Palavras-chave: estresse oxidativo, criosobrevivência, criopreservação, embriões bovinos.

¹Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Melhoramento e Genética Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (47 p.) Março, 2019.

EFFECT OF β -MERCAPTOETHANOL ON THE VITRIFICATION CRYOTOLERANCE OF BOVINE IVP EMBRYOS²

Author: Karine de Mattos

Advisor: Dr. Marcelo Bertolini

ABSTRACT – The control of oxidative processes in the *in vitro* production (IVP) of bovine embryos using additives might be an alternative approach to improve embryo cryotolerance. The aim of this study was to verify the effect of β -mercaptoethanol (β ME) on the cryotolerance IVP of bovine embryos, in two experiments. In Experiment I, IVP embryos were vitrified at the blastocyst stage on Day 7 of development. After warming, embryos were *in vitro*-cultured in medium containing 0, 50 or 100 μ M β ME for 72 h, when hatching rates were assessed. The best β ME concentration in Experiment I was used in Experiment II. In Experiment II, following IVM-IVF, presumptive zygotes were *in vitro*-cultured in the presence (CIV treatment) or absence of β ME, for 7 days. Excellent and good embryos quality were vitrified; after warming, embryos were randomly allocated to one of two sub-groups and cultured in fresh SOF medium supplemented (CPA treatment) or not with β ME an extra 72 h until the hatching blastocyst (HBL) stage. Experimental groups were composed as following: G1 (β ME-free medium during CIV and CPA); G2 (β ME only during CPA); G3 (β ME only during CIV); G4 (β ME during CIV and CPA). In the Experiment I, a higher hatching rate was observed when using 100 μ M β ME concentration. In Experiment II, the use of β ME during CIV did not affect cleavage rates (G1, 80.2% vs. G3, 81.1%). However, β ME affected development to the blastocyst stage (G1, 28.0% vs. G3, 43.8%). Additionally, following vitrification, β ME supplementation during CIV, with or without addition in the CPA, improved re-expansion rate (CIV 84.0% and CIV/CPA 87.5% vs. control 71.0%). The β ME in the CPA improved hatching rates (G2, 58.1% and G4, 63.8%) compared with groups without the additive (G1, 36.6% and G3, 42.0%). Moreover, the presence of β ME neither during CIV or CPA, or even during both culture periods, increased total cell number in HBL from vitrified embryos. In conclusion, the addition of β ME during the CIV period did not affect cleavage, but reduced blastocyst yield. Despite that, β ME supplementation during the CIV period increased the cryotolerance of the resulting blastocysts, expressed by an increasing in the reexpansion rate, whereas β ME supplementation during the CPA period improved embryo survival after the vitrification process, manifesting by higher hatching rates and higher total cell numbers in HBL.

Keywords: oxidative stress, cryosurvival, cryopreservation, bovine embryo.

²Master of Science dissertation in Animal Science - Animal Breeding and Genetics, Agricultural College, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (47 p.) Março, 2019.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Espécies reativas de oxigênio	14
2.1.1 Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	15
2.1.2 Hidróxido de Hidrogênio (H_2O_2)	15
2.1.3 Hidroxila (OH^{\cdot})	16
2.1.4 Oxigênio Molecular Singlete (1O_2)	16
2.2 Estresse oxidativo.....	16
2.2.1 Estresse oxidativo em embriões bovinos.....	17
2.3 Antioxidantes biológicos	17
2.3.1 Glutaciona	19
2.3.2 Precursores da Glutaciona	20
2.4 Criopreservação de embriões bovinos.....	21
2.4.1 Vitriificação	22
3. HIPÓTESES E OBJETIVOS.....	25
3.1 Hipótese.....	25
3.2 Objetivo geral.....	25
3.3 Objetivos específicos	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1 Meios e reagentes químicos, e condições experimentais.....	26
4.2 Produção <i>in vitro</i> (PIV) de embriões bovinos.....	26
4.2.1 Maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	26
4.2.2 Seleção dos espermatozoides	26
4.2.3 Fecundação <i>in vitro</i> (FIV).....	26
4.2.4 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	27
4.3 Criopreservação de blastocistos	27
4.3.1 Vitriificação dos embriões.....	27
4.3.2 Aquecimento e cultivo <i>in vitro</i> dos embriões pós-aquecimento	27
4.4 Estimativa do número total de células em embriões	28
4.5 Delineamento Experimental	28
4.6 Análise estatística dos dados	30
5. RESULTADOS.....	31
6. DISCUSSÃO	35
7. CONCLUSÕES	38
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	39
9. REFERÊNCIAS	40
10. VITA.....	40

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Taxa de eclosão de blastocistos bovinos submetidos a vitrificação e aquecimento, cultivados em meio SOF (Controle), suplementado com 50 μm de βME (50- βME) ou 100 μm de βME (100- βME)31
- Tabela 2. Taxas de clivagem, blastocisto e qualidade embrionária após o cultivo em meio suplementado (βME) ou não (Controle) com 100 μm de βME durante o cultivo *in vitro* (CIV).....32
- Tabela 3. Taxa de reexpansão e eclosão de blastocistos bovinos tratados com βME somente durante o cultivo pós-aquecimento (CPA), somente durante o cultivo *in vitro* prévio a vitrificação (CIV), em ambos os momentos (CIV/CPA) ou em nenhum momento (Controle).....33

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação esquemática de uma molécula estável, com elétrons associados em pares e um radical livre, contendo um elétron desemparelhado na camada de valência.....14
- Figura 2. Representação esquemática da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a ação de antioxidante nas moléculas. O superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é produzido em quantidades intracelulares, tanto no citosol via enzimas contendo flavina, como nas mitocôndrias, principalmente devido à fuga de elétrons da cadeia respiratória. Duas moléculas de superóxido rapidamente dismutam em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), este último permitindo o fluxo de EROs entre os compartimentos celulares. O H_2O_2 pode ser enzimaticamente metabolizado em O_2 e água (H_2O) por vários sistemas enzimáticos diferentes ou convertido em hidroxila (OH^{\cdot}) que é extremamente reativo, através de uma reação química catalisada por metais de transição..... 15
- Figura 3. Representação esquemática de uma molécula antioxidante doando um elétron a um radical livre.....18
- Figura 4. Técnica *glass micropipettes* (GMP) de vitrificação de embriões bovinos. Etapas envolvendo o aquecimento e a diluição dos crioprotetores no capilar. A: GMP no nitrogênio líquido; B: GMP exposta ao ar; C: GMP mergulhada no tubo com meio de aquecimento; D: Transferência do conteúdo da GMP a uma palheta de 0,25 ml; E: Palheta contendo o embrião pronta para a inovulação.....23
- Figura 5. Desenho experimental do Experimento II.....28
- Figura 6. Desenho experimental do Experimento II.....29
- Figura 7. Distribuição dos diferentes estádios de desenvolvimento embrionário no Dia 7 de cultivo *in vitro* nos grupos Controle e β ME. *indica diferença significativa ($P<0,05$). BE: Blastocisto eclodido; BN: Blastocisto em eclosão; BX: Blastocisto expandido; BL: Blastocisto; BI: Blastocisto inicial.....32
- Figura 8. Taxa de eclosão de blastocistos bovinos após cultivo *in vitro* pós-vitrificação por 72 h, tratados com β ME somente durante o cultivo pós-aquecimento (CPA), somente durante o cultivo *in vitro* prévio a vitrificação (CIV), em ambos os momentos (CIV/CPA) ou em nenhum momento (Controle).....33
- Figura 9. Número total de células em embriões eclodidos tratados com β ME somente durante o cultivo pós-aquecimento (CPA), somente durante o cultivo *in vitro* prévio à vitrificação (CIV), em ambos os momentos (CIV/CPA) ou em nenhum momento (Controle).....34

LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS

- $^1\text{O}_2$ – Oxigênio singlete
BSA – Albumina sérica bovina
BE – Blastocisto eclodido
BI – Blastocisto inicial
BL – Blastocisto
BN – Blastocisto em eclosão
BX – Blastocisto expandido
 β ME – β -mercaptoetanol
CAT – Catalase
CCOs – Complexos *cumulus*-oócito
CIV – Cultivo *in vitro*
CPA – Cultivo pós-aquecimento
EG – Etileno glicol
EROs – Espécies reativas de oxigênio
FIV – Fecundação *in vitro*
FSH – Hormônio folículo estimulante
GMP – *Glass micropipettes*
GPx – Glutaciona peroxidase
GR – Glutaciona redutase
GSH – Glutaciona
GSSG – Glutaciona oxidada
GST – Glutaciona S-transferase
H₂O – Água
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
HBL – *Hatching blastocyst*
HO₂[•] – Hidroperoxila
HOCl – Ácido hipocloroso
IETS – *International Embryo Technology Society*
IVP – *in vitro* embryo production
MIV – Maturação *in vitro*
O₃ – Ozônio
O₂^{•-} – Superóxido
OH[•] – Hidroxila
OPS – *Open pulled straw*
PBS – Solução salina tamponada com fosfato
PIV – Produção *in vitro*
PRO – Propileno glicol
RL – Radical livre
RO[•] – Alcoxila
RO₂[•] – Peroxila
SEE – Soro de égua em estro
SOD – Superóxido dismutase
SOFaaci – Flúido sintético de oviduto com aminoácidos, citrato de sódio e mio-
 inositol

1. INTRODUÇÃO

As biotecnologias animais, especialmente as reprodutivas, são ferramentas indispensáveis para promover o melhoramento na produtividade dos rebanhos bovinos. A ampla utilização dessas biotecnologias pode influenciar diretamente no aumento da eficiência reprodutiva, acelerando programas de melhoramento genético destinados a obter produtos de origem animal em maior número, melhor qualidade e menor custo. Nesse contexto, a produção *in vitro* (PIV) de embriões pela fecundação *in vitro* (FIV) se destaca como uma importante biotécnica da reprodução.

Mesmo com os avanços nas técnicas de PIV, o desenvolvimento embrionário *in vitro* é inferior ao *in vivo*, sendo que as taxas de blastocistos giram em torno de 30 a 40% para embriões FIV contra 60% para embriões *in vivo* (Rizos, 2002), sem significativas melhoras desde a última década. Entretanto, conforme levantamento anual da *International Embryo Technology Society* (IETS; Viana, 2018), em 2017 o número de embriões bovinos produzidos e transferidos foi maior em embriões PIV que em embriões *in vivo*, representando um aumento de 48,9% em embriões PIV e uma redução de 21,7% em embriões *in vivo* em relação a 2016. Além disso, apesar da América do Sul ser a líder no número de embriões transferidos, pela primeira vez desde 1999, a América do Norte produziu mais embriões PIV que a América do Sul, sendo os EUA responsável por produzir aproximadamente 45% (454.550) e o Brasil 34% (345.528) dos embriões bovinos PIV no mundo (Viana, 2018).

A criopreservação tem um grande impacto neste cenário, pois permite o armazenamento dos embriões por tempo indeterminado, proporciona a flexibilização da utilização dos embriões, permite a comercialização, facilitando a importação e exportação e o estabelecimento de bancos genéticos. Segundo Sartori (2016), nos últimos anos ocorreu um incremento na taxa de embriões PIV criopreservados no Brasil, sendo que em 2015, 29% dos embriões produzidos *in vitro* foram criopreservados. Entretanto, mesmo com esse aumento, em 2017 apenas 33,9% dos embriões PIV transferidos eram criopreservados, contrastando com os 60,1% dos embriões obtidos *in vivo*. Ademais, apenas 18,7% dos embriões exportados eram de PIV (Viana, 2018). Estes dados podem ser justificados devido à menor criotolerância dos embriões produzidos *in vitro*, levando a uma baixa eficiência na produção de blastocistos transferíveis após a PIV por FIV e criopreservação (Chian, 2004). Deste modo, a baixa eficiência da criopreservação de embriões constitui um grande obstáculo para a disseminação da técnica e expansão do mercado internacional.

Diferentes estudos vêm demonstrando que uma diferença na produção de embriões *in vitro* e *in vivo* pode estar associada à excessiva produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nos sistemas de cultivo *in vitro*. De acordo com Deleuze (2010), as modificações oxidativas dos componentes celulares através do incremento de EROs representam o principal indutor de estresse no cultivo. Além disto, o conteúdo lipídico intracitoplasmático dos embriões produzidos *in vitro* são diferentes daqueles produzidos *in vivo*, comprometendo a qualidade dos embriões PIV (Seidel, 2006), aumentando a sensibilidade ao estresse oxidativo e, conseqüentemente, afetando diretamente o sucesso da criopreservação (Guérin et al., 2001).

Estudos utilizando precursores de antioxidantes durante a PIV, principalmente aqueles de baixo peso molecular, têm sido relatados com efeitos favoráveis no desenvolvimento embrionário. A utilização de β -mercaptoetanol (β ME), um importante precursor do antioxidante glutatona, em diferentes etapas da PIV, resultou na manutenção da homeostase oxidativa e na proteção dos blastômeros contra os efeitos de lesões oxidativas, elevando a taxa de blastocistos (Takahashi et al., 1993; Caamaño et al., 1997; Geshi et al., 1999; De Matos & Furnus 2000; Takahashi et al., 2002; Feugang et al., 2004). Entretanto, há escassos estudos que investigam os efeitos dos precursores de antioxidantes, principalmente o β ME, no processo de criopreservação de embriões por meio da vitrificação (Nedambale et al., 2006; Hosseini et al., 2009; Rocha-Frigoni et al., 2014).

Sabendo-se que o estresse oxidativo é um dos principais limitantes no desenvolvimento embrionário *in vitro* e da criosobrevivência, e que o β ME desempenha um papel importante na homeostase oxidativa e proteção celular, este estudo buscou avaliar os efeitos da suplementação com β ME antes e após a vitrificação sobre a qualidade e criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro* pela FIV.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Espécies reativas de oxigênio

Os elétrons que compõe a estrutura de átomos e moléculas geralmente estão associados em pares que se movem em uma região definida do espaço. Quando um átomo possui um ou mais elétrons desemparelhados na camada de valência, forma-se uma molécula denominada radical livre (RL; Figura 1; Ribeiro, 1989; Halliwell & Cross, 1994; Bergendi, 1999). Tais elétrons podem ocorrer em átomos de hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, carbono, enxofre e em átomos de metais em transição (Rover et al., 2001). Os RLs, de modo geral, possuem uma meia-vida curta e alta reatividade com outras biomoléculas, como proteínas, lipídeos e DNA (Halliwell & Cross, 1994).

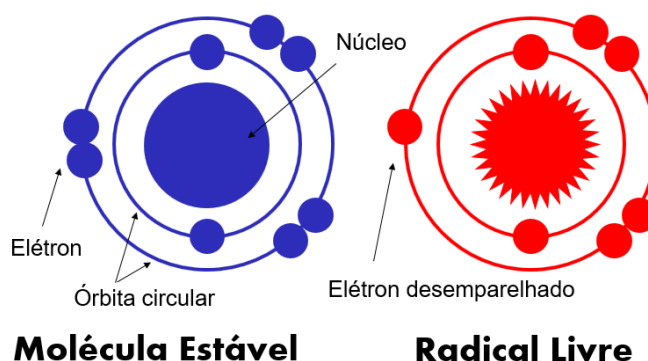


Figura 1. Representação esquemática de uma molécula estável, com elétrons associados em pares e um radical livre, contendo um elétron desemparelhado na camada de valência.

Além dos RLs, existem moléculas derivadas do metabolismo do oxigênio, que apesar de não possuírem elétrons desemparelhados, são altamente reativas devido à instabilidade, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ácido hipocloroso ($HOCl$), o ozônio (O_3) e o oxigênio singlete (1O_2). Essas moléculas em conjunto com os RLs oriundos do oxigênio, como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila (OH^{\cdot}), peroxila (RO_2^{\cdot}), alcóxila (RO^{\cdot}) e hidroperoxila (HO_2^{\cdot}), formam as espécies reativas de oxigênio (EROs; Ribeiro et al., 2005; Circu & Aw, 2010).

De modo geral, as EROs atuam na regulação da expressão de genes sensíveis aos sinais redox e nas alterações de homeostase celular, por meio da síntese de moléculas fisiologicamente ativas (Gamaley & Klyubin, 1999). Apesar das funções biológicas desempenhadas pelas EROs, estas, quando produzidas em maiores quantidades, podem provocar danos ao DNA, RNA, proteínas, membranas celulares e enzimas por meio da interação com diversas moléculas, doando ou recebendo elétrons e, conseqüentemente, levando a perdas de função ou morte celular (Rover et al., 2001).

As EROs são produzidas fisiologicamente por várias vias metabólicas e enzimáticas, como ciclooxigenação, lipooxigenação, peroxidação lipídica, radiação ultravioleta, entre outros (Guérin et al., 2001; Nimse & Pal, 2015), sendo a fosforilação oxidativa nas mitocôndrias a maior fonte intracelular de EROs (Figura 2; Feugang et al., 2004). Durante a respiração celular ocorre a formação de água (H_2O) pela adição de quatro elétrons em cada molécula de

O_2 . Como o O_2 tende a receber um elétron de cada vez, acaba formando moléculas intermediárias altamente reativas e instáveis, como o ânion superóxido (um elétron), peróxido de hidrogênio (dois elétrons) e radical hidroxila (três elétrons; Cheeseman & Slater, 1993; Sies, 1997; Bergendi, 1999, Bigarella, et al., 2014).

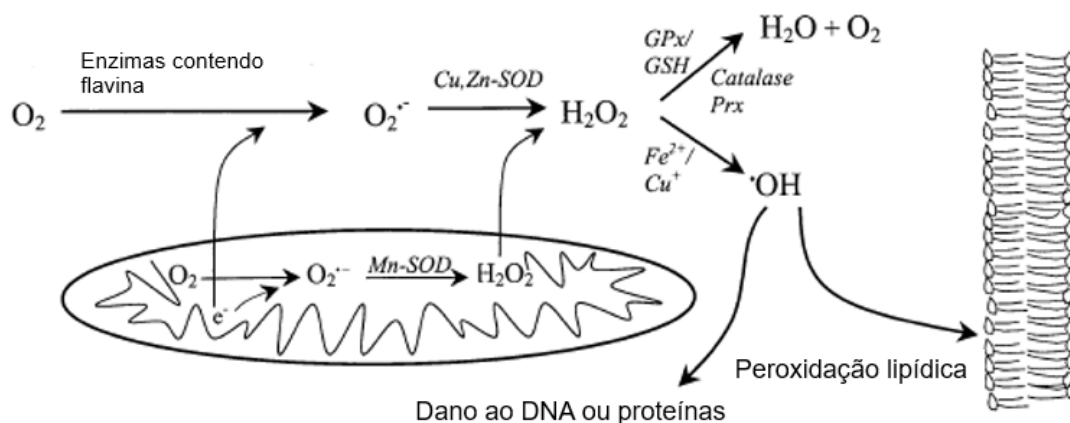


Figura 2. Representação esquemática da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a ação de antioxidante nas moléculas. O superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é produzido em quantidades intracelulares, tanto no citosol via enzimas contendo flavina, como nas mitocôndrias, principalmente devido à fuga de elétrons da cadeia respiratória. Duas moléculas de superóxido rapidamente dismutam em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), este último permitindo o fluxo de EROs entre os compartimentos celulares. O H_2O_2 pode ser enzimaticamente metabolizado em O_2 e água (H_2O) por vários sistemas enzimáticos diferentes ou convertido em hidroxila ($\cdot OH$) que é extremamente reativo, através de uma reação química catalisada por metais de transição. Fonte: Adaptado de Nordberg & Arnér (2001).

2.1.1 Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

O ânion $O_2^{\cdot-}$, formado a partir da adição de um elétron ao O_2 , é uma molécula instável, com vida média de milissegundos e que dificilmente atravessa membranas, agindo no local onde foi produzido e possuindo baixa reatividade (Nordberg & Arnér, 2001). A produção de $O_2^{\cdot-}$ ocorre especialmente em ambientes aeróbicos ricos em elétrons como a mitocôndria, mas também pode ser produzido por flavoenzimas (Figura 2), lipoxigenases e cicloxygenases. Após ser produzido, o $O_2^{\cdot-}$ é rapidamente dismutado em H_2O_2 através da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), sendo este, um sistema endógeno celular de eliminação de EROs (Figura 2; Cheeseman & Slater, 1993; Bergendi, 1999; Forman et al., 2009).

2.1.2 Hidróxido de Hidrogênio (H_2O_2)

O H_2O_2 formado é mais estável e apresenta meia vida longa, podendo ser capaz de atravessar camadas lipídicas, possibilitando a ocorrência de reações em compartimentos distantes de onde foi formado, como por exemplo, a indução de alterações cromossômicas (Ribeiro, 1989; Nordberg &

Arnér, 2001; Ribeiro et al., 2005). De modo geral, o H_2O_2 possui um papel intermediário, pois participa da formação de mais EROs e pode ser reduzido a H_2O e O_2 por vários antioxidantes celulares (Bigarella et al., 2014). Ao reagir com Fe^{2+} ou Cu^+ , o H_2O_2 produz o radical OH^\bullet , que pode reagir com qualquer molécula próxima de onde foi produzida, devido à meia vida muito curta (Figura 2; Cheeseman & Slater, 1993). Além disso, o H_2O_2 também possui função de molécula de sinalização intracelular (Nordberg & Arnér, 2001).

2.1.3 Hidroxila (OH^\bullet)

O radical OH^\bullet é considerado a EROs mais deletéria, capaz de causar danos em diversos sistemas biológicos, reagindo amplamente com aminoácidos, DNA e RNA (Nordberg & Arnér, 2001). É formado após íons metálicos catalisarem o H_2O_2 (Figura 2). Ao ser produzido próximo da membrana, os lipídeos podem ser oxidados pelo OH^\bullet e iniciar uma reação em cadeia de RLs que irá lesionar a membrana e levar à inativação da função proteica (Forman et al., 2009).

2.1.4 Oxigênio Molecular Singlete ($^1\text{O}_2$)

O oxigênio molecular (triplete), por possuir dois elétrons desemparelhados no orbital antiligante π^* (bi-radical), poderia reagir com moléculas de semelhança estrutural, mas devido ao princípio de restrição de Pauli, o qual restringe a reatividade de uma molécula quando os elétrons apresentam spins paralelos, o átomo de oxigênio não reage com tais moléculas, conferindo a este uma alta estabilidade. Entretanto, ao ser excitado eletronicamente, há formação de oxigênio molecular singlete, que por sua vez é extremamente reativo, pois nessa molécula, a restrição de Pauli desaparece, assim o $^1\text{O}_2$ pode reagir com lipídeos de membranas, proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, carboidratos e grupos tios (Halliwell & Gutteridge, 1985; Sies, 1997; Bergendi, 1999; Rover et al., 2001; Ribeiro et al., 2005).

2.2 Estresse oxidativo

O desequilíbrio entre a formação de espécies reativas de oxigênio e a capacidade do organismo de neutralizar sua ação pelos sistemas antioxidantes caracterizam o estado de estresse oxidativo (Sies, 1997; Persson et al., 2014), favorecendo danos celulares por ações em biomoléculas como DNA, lipídeos, proteínas e carboidratos, podendo levar à morte celular por apoptose (Ribeiro et al., 2005).

O aumento da quantidade de EROs pode estar associado à redução, inativação e diminuição da produção das enzimas antioxidantes ou ao aumento do nível de componentes endógenos ou exógenos que entram em auto-oxidação juntamente com a produção de EROs, como por exemplo, danos à membrana mitocondrial e estrutura de proteínas, que podem aumentar a geração de EROs (Pisoschi & Pop, 2015).

Durante o estresse oxidativo, os ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas celulares são os mais susceptíveis à oxidação (peroxidação lipídica), causando uma reação em cadeia que se não terminada, pode causar profundos efeitos na função celular pela destruição de fases lipídicas, alterando especialmente membranas celulares, levando ao aumento da

permeabilidade, ruptura ou diminuição do potencial de membrana (Cheeseman & Slater, 1993; Betteridge, 2000; Ribeiro et al., 2005; Pisoschi & Pop, 2015). Esta reação em cadeia, se não contida por mecanismos antioxidativos endógenos, pode levar a danos irreversíveis e à morte celular.

2.2.1 Estresse oxidativo em embriões bovinos

Os oócitos possuem aproximadamente cem vezes mais mitocôndrias se comparados a células somáticas, sendo estas responsáveis pelo consumo de oxigênio e formação de EROs (Takahashi et al., 2012). Deste modo, a manutenção do equilíbrio entre a produção de EROs e as defesas antioxidantes, denominada homeostase oxidativa, é imprescindível para a correta divisão e diferenciação celular dos embriões, já que estes são particularmente sensíveis à exposição as EROs.

Na PIV de embriões, o estresse oxidativo verificado nos sistemas de cultivo *in vitro* é um aspecto limitante, consistindo em uma das principais causas da baixa eficiência da maturação oocitária e desenvolvimento embrionário, comprometendo a qualidade, levando a uma baixa taxa de embriões viáveis ou até mesmo ao bloqueio do desenvolvimento (Nars-Esfahani & Johnson, 1991; Feugang et al., 2004; Deleuze et al., 2010; Cagnone & Sirard, 2013).

In vivo, durante a maturação do oócito, fecundação e desenvolvimento embrionário, antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos estão presentes no fluido folicular, nas células do complexo *cumulus*-oócito (COC) e nas secreções do trato reprodutivo (Guérin et al., 2001; Livingston et al., 2004). Além disto, a tuba uterina fornece ao embrião o ambiente ideal para o seu desenvolvimento, mantendo a concentração de O₂ ao redor de 5 a 8% (Feugang et al., 2004; Harvey, 2007; Cagnone & Sinard, 2013). Já nos sistemas de cultivo *in vitro* de embriões, as concentrações de EROs intracelulares estão aumentadas devido a maior tensão de oxigênio (em torno de 20%), cátions metálicos, excesso de glicose, luz visível, espermatozoides, criopreservação e insuficientes mecanismos de defesa fisiológicos, promovendo um incremento no estresse oxidativo (Caamaño et al., 1997; Guérin et al., 2001; Agarwal et al., 2014). Além dessas diferenças nos sistemas de cultivo *in vitro*, desde a maturação *in vitro* os oócitos acumulam mais lipídios em relação aos *in vivo* (Rizos et al., 2002), deste modo, devido ao aumento das EROs *in vitro*, da maior concentração lipídica intracelular e conseqüentemente maior disponibilidade de lipídeos para oxidação, há o aumento da peroxidação nas membranas celulares causada pelas EROs. Além disso, a criopreservação devido aos danos os componentes e membrana celular, aumenta a peroxidação lipídica, tornando as células mais susceptíveis às ações das EROs (Agarwal, 2006).

2.3 Antioxidantes biológicos

As EROs têm funções fisiológicas definidas, entretanto concentrações elevadas devem ser evitadas pelo organismo devido às propriedades deletérias já descritas anteriormente. Dentre os mecanismos de defesa do organismo que previnem a formação das EROs estão os antioxidantes (Sies, 1997; Ribeiro et al., 2005). Segundo Halliwell e Gutteridge (1985), antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que retarda significativamente ou inibe a oxidação de um substrato oxidável. Os

antioxidantes atuam por meio de três mecanismos, sendo de prevenção, varredores ou *scavengers*, e de reparo (Cheeseman & Slater, 1993). O mecanismo de prevenção atua contra o dano oxidativo, impedindo a formação de EROs. Os varredores neutralizam as EROs, impedindo a ação através da reação direta, aceitando ou doando elétrons, pois a estrutura dos antioxidantes permite que elétrons desemparelhados se mantenham estáveis sem atacar outras moléculas (Figura 3). Por fim, o mecanismo de reparo remove as biomoléculas danificadas, antes que estas levem a alterações do metabolismo celular, além de atuar na reconstituição das estruturas biológicas lesadas (Barbosa et al., 2010; Pisoschi & Pop, 2015).

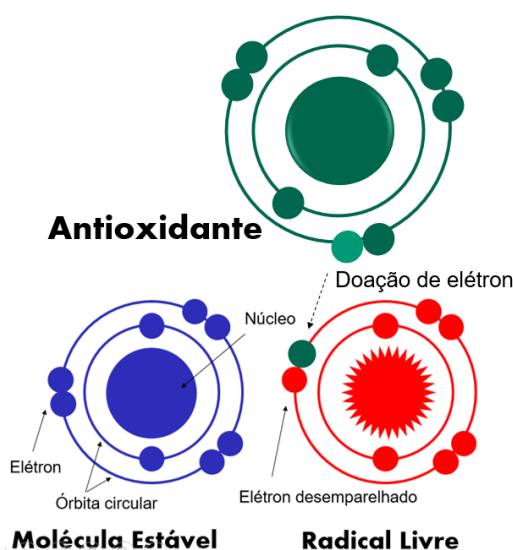


Figura 3. Representação esquemática de uma molécula antioxidante doando um elétron a um radical livre.

As células possuem múltiplos tipos de antioxidantes que são específicos para diferentes EROs (Bigarella et al., 2014). Além disto, os sistemas de defesa antioxidante se classificam em enzimáticos e não enzimáticos, estando presentes tanto no meio intra- como extracelular, podendo atuar em conjunto entre estes (Cheeseman & Slater, 1993).

Os antioxidantes enzimáticos geralmente são os primeiros a agirem, e atuam através da quebra e remoção das EROs, convertendo produtos oxidativos perigosos em H_2O_2 e na sequência, em H_2O , além de serem muito importantes para a prevenção da peroxidação lipídica (Nimse & Pal, 2015). As enzimas incluídas nesta categoria são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPx). Os antioxidantes não enzimáticos podem ser naturais ou sintéticos e atuam interrompendo a reação em cadeia das EROs. A glutathiona (GSH) e as vitaminas C e E fazem parte deste grupo (Feugang et al., 2004; Nimse & Pal, 2015).

A função dos antioxidantes implica na redução do estresse oxidativo, mutações do DNA, transformações malignas, como outros parâmetros de dano celular (Cheeseman & Slater, 1993; Pisoschi & Pop, 2015). De modo geral, todas as células em organismos eucarióticos contêm poderosas enzimas antioxidantes que operam em conjunto para manter os níveis de EROs dentro dos limites

fisiológicos (Lushchak, 2014), e devido a diferenças entre a meia vida da maioria das EROs, tornam-se necessários diferentes tipos de mecanismos de defesa celular (Sies, 1997).

Estudos buscando otimizar a PIV de embriões vêm demonstrando que a suplementação com moléculas antioxidantes pode ser uma interessante estratégia para controlar a quantidade de EROs em embriões de diferentes espécies, mantendo as funções fisiológicas, contrapondo o aumento indiscriminado de EROs no sistema *in vitro* (Caamaño et al., 1997; Guérin et al., 2001; Nedambale et al., 2006; Hosseini et al., 2009). Portanto, faz-se necessária a condução de mais estudos envolvendo a suplementação de meios utilizados na PIV e em procedimentos de estresse como a criopreservação com substâncias que direta ou indiretamente previnam ou neutralizem a ação de antioxidantes ou reparem os danos subsequentes. Neste contexto, a glutathiona como agente antioxidante não enzimático ocupa papel de grande relevância na proteção celular às EROs.

2.3.1 Glutathiona

A glutathiona (GSH) é considerada o antioxidante de baixo peso molecular mais importante dentre os produzidos nas células, desempenhando um papel principal na remoção de muitas EROs, protegendo as células dos danos oxidativos por meio da interação direta, ou seja, doação de elétrons catalisada pela GPx ou servindo como cofator para enzimas (Forman et al., 2009; Deleuze et al., 2010; Guemra, 2013). Além disto, a GSH participa em inúmeros processos metabólicos no organismo, como transporte de aminoácidos (principalmente cisteína), modulação da transdução de sinal, regulação da proliferação celular e regulação da resposta imune, sendo que a depleção pode resultar em danos irreversíveis às células (Forman et al., 2009).

A GSH é um tripeptídeo formado por glicina, glutamato e cisteína e é o tiol livre mais abundante nas células eucarióticas, mantendo-se principalmente no meio intracelular (Sies & Cadenas, 1985). A sua síntese varia de acordo com a biodisponibilidade dos aminoácidos no meio extracelular, especialmente a cisteína (Rover et al., 2001). Nas células, a glutathiona pode ser encontrada na forma reduzida, denominada simplesmente glutathiona (GSH) e na forma oxidada, denominada glutathiona dissulfeto (GSSG), e sua regulação (síntese e degradação) é realizada por meio do ciclo da gama-glutamil que mantém a homeostase e o *status* redox normal. Nos tecidos saudáveis, cerca de 90% da glutathiona existente encontra-se na forma de GSH (Schafer & Buettner, 2001, Circu & Aw, 2010; Deluze et al., 2010), sendo uma potente reserva antioxidante nas células.

Entre os antioxidantes, a GSH possui um importante papel na proteção embrionária contra os efeitos negativos das EROs, com a síntese sendo dependente da disponibilidade de cisteína presente no meio de cultivo. Entretanto, este aminoácido é estável somente por uma hora no meio, sendo oxidado rapidamente em cistina, conseqüentemente, prejudicando a síntese de GSH (Sagara et al., 1993). Em oócitos maturados *in vitro*, os níveis de GSH são menores quando comparados com aqueles oócitos ovulados, possivelmente devido à baixa disponibilidade de cisteína *in vitro* (De Matos et al., 1996; Hara et al., 2013). Além disto, a diferente concentração de oxigênio *in vivo* e *in vitro* faz

com que oócitos e embriões cultivados *in vitro* mobilizem maior quantidade de GSH para combater as EROs.

2.3.2 Precusores da Glutathiona

Estudos anteriores fornecem evidências de que o desenvolvimento embrionário ótimo *in vitro* é parcialmente dependente da presença de aminoácidos precusores para a síntese de GSH intracelular (Caamaño et al., 1998; De Matos & Furnus, 2000; Furnus *et al.*, 2008; Deleuze & Goudet, 2010). Já é conhecido que o β -mercaptoetanol e a cisteamina reduzem a cistina à cisteína, promovendo a absorção de cisteína, aumentando a síntese de GSH (De Matos et al., 1995). Assim, a utilização de substâncias que auxiliam na síntese de GSH pode exercer um efeito importante de proteção contra as EROs nos sistemas de PIV de embriões.

Cisteamina: A cisteamina é um amino tiol derivado da degradação da coenzima A. Essa degradação forma a panteteína que é hidrolisada em cisteamina e ácido pantotênico. Quando em baixas concentrações, a cisteamina promove o transporte de cisteína para dentro das células, que é utilizada para a síntese de GSH, e em altas doses, pode ter efeito oposto, causando estresse oxidativo (Besouw et al., 2013). Estudos anteriores demonstraram que a suplementação de baixas doses de cisteamina no meio de maturação *in vitro* (MIV) aumentou o conteúdo de GSH intracelular em oócitos bovinos e melhorou a taxa de desenvolvimento e qualidade embrionária (De Matos et al., 1995; De Matos & Furnus, 2000). Deste modo, a utilização de cisteamina em doses não tóxicas é uma interessante alternativa para incrementar os níveis de GSH no cultivo *in vitro*. Por tal razão, atualmente, a cisteamina é componente padrão nos meios de MIV.

β -mercaptoetanol: O β -mercaptoetanol (β ME) é um tiol de baixo peso molecular que interage diretamente com alguns radicais oxidados. Atua como precursor da GSH, protegendo a cisteína da oxidação para a cistina através da redução de pontes de dissulfeto encontradas em moléculas de cistina, liberando cisteína, aumentando sua absorção pelas células e, conseqüentemente, induzindo à síntese de GSH (Takahashi et al., 1993; Feugang et al., 2004).

Em 1993, Takahashi e colaboradores realizaram um estudo, onde pela primeira vez utilizou-se β ME no meio de cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Os resultados desse estudo sugeriram que o aumento da glutathiona intracelular por compostos tiol, como o β ME, pode gerar embriões com melhores condições intracelulares, pela prevenção de danos oxidativos. Além disso, nesse estudo a taxa de blastocistos foi superior nos grupos que receberam suplementação de β ME. Entretanto, também foi verificado que quando o β ME é utilizado em altas doses, o tiol pode apresentar efeitos tóxicos para o cultivo *in vitro* de embriões, impactando negativamente na taxa de eclosão.

Os estudos que seguiram, relataram que tiois de baixo peso molecular, como o β ME, quando presentes durante a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos, estimulam a síntese de GSH e reduzem os níveis de peroxidação lipídica, com melhora do desenvolvimento embrionário (De Matos et al., 1996; Chen et al., 2005), proporcionando uma reserva disponível até as primeiras

clivagens, melhorando a eficiência da PIV de embriões a partir de oócitos imaturos (De Matos & Furnus, 2000).

Inúmeros estudos que avaliaram a ação do β ME no desenvolvimento embrionário verificaram que efeito positivo na taxa de blastocistos, quando concentrações baixas do tiol foram utilizadas (Takahashi et al, 1993; Caamaño et al; 1998; Geshi, 1999; Hosseini et al, 2009). No estudo de Otoi e colaboradores (2000) foi verificado também o efeito da adição de β ME no meio de cultivo *in vitro* de embriões de qualidade 3 (escala de 1 a 5, onde 1 é excelente e 5 é degenerado), 24 horas antes do congelamento convencional, e encontraram uma tendência de melhora na taxa de desenvolvimento nos embriões cultivados na presença de β ME, entretanto, não houve diferença significativa nas taxas de sobrevivência embrionária.

Coletivamente, está bem estabelecido que os antioxidantes fornecem proteção contra o estresse oxidativo aos embriões produzidos *in vitro*, aumentando as taxas de desenvolvimento embrionário e qualidade dos embriões obtidos quando utilizados em doses adequadas. Porém, são raros os estudos que avaliam a ação dos antioxidantes, especialmente o β ME, na criotolerância de embriões bovinos (Otoi et al., 2000), uma vez que os eventos físico-químicos antes, durante e após a criopreservação estão associados a lesões muitas vezes decorrentes da geração de EROs (Feugang et al., 2004; Nedambale et al., 2006).

2.4 Criopreservação de embriões bovinos

A criopreservação de embriões bovinos é uma importante ferramenta que permite a conservação de embriões por tempo indeterminado, facilitando deste modo, o comércio, exportação e importação deste material. Além disso, flexibiliza a inovulação dos embriões, possibilitando a escolha do momento mais adequado para sua realização, e permite o estabelecimento de bancos genéticos. O primeiro nascimento de embrião bovino criopreservado ocorreu em 1973 (Wilmot & Rowson, 1973) e desde então a prática de criopreservação de embriões tem se tornado cada vez mais popular na reprodução bovina.

A criopreservação é definida pelo uso de temperaturas muito baixas para preservar células e tecidos vivos estruturalmente intactos (Pegg, 2007), pois ao redor de -196°C , o metabolismo celular permanece em estado de quiescência, o que torna possível o armazenamento em tempo indeterminado.

Diversos fatores influenciam o sucesso da criopreservação de embriões, como a composição dos meios de congelamento, as taxas de resfriamento e aquecimento, as condições de cultivo pré- e pós-criopreservação, entre outros (Vajta et al., 2009). De modo geral, os protocolos de congelamento utilizam uma combinação de desidratação, redução do ponto de congelamento, super-resfriamento e vitrificação intracelular, na tentativa de evitar danos celulares (Prentice & Anzar, 2011; Mandawala & Harvey et al., 2016).

Durante a criopreservação, utilizam-se crioprotetores permeáveis e não permeáveis para causar uma mudança no estado isotônico entre o meio intra- e extracelular da célula, o que provoca mudanças no volume celular. Devido à hiperosmolaridade inicial do crioprotetor extracelular, durante o congelamento há um efluxo de água da célula, resultando em murchamento celular. Já durante o descongelamento, há um influxo rápido de água na célula

devido à maior concentração de soluto intracelular, o que pode resultar em choque osmótico e lise celular se o crioprotetor permeável não sofrer efluxo da célula (Fahning & Garcia, 1992; Moisan, 2006).

Embriões que passam pela criopreservação são expostos a diferentes tipos de danos, tanto físicos, como químicos. Quando a taxa de resfriamento é muito rápida para permitir que a água saia da célula, há formação de cristais do gelo intracelular que causam lesões nas membranas e podem danificar organelas celulares (Moisan 2006). Em embriões criopreservados verifica-se maior estresse oxidativo e estresse osmótico (George et al., 2006). Ademais, estudos demonstraram que embriões produzidos *in vitro* são mais sensíveis à criopreservação que aqueles produzidos *in vivo* (Chian, 2004), pois a maior quantidade de EROs verificada durante o cultivo *in vitro*, combinada com a maior quantidade de lipídeos intracitoplasmáticos em embriões de PIV, promovem expressiva peroxidação lipídica e menor criotolerância (Agarwal, 2006; Seidel, 2006; Deleuze, 2010).

Os protocolos de criopreservação de embriões bovinos podem ser divididos em quatro categorias: congelamento lento, congelamento rápido ou convencional, congelamento ultra-rápido e vitrificação. As três primeiras categorias envolvem a formação de gelo extracelular, enquanto que na vitrificação, forma-se um estado de alta viscosidade do meio extracelular, sem a formação de cristais de gelo. O congelamento convencional é utilizado ao redor do mundo em embriões *in vivo* resultando em taxas satisfatórias de prenhez, entretanto, estudos vêm demonstrando que embriões PIV vitrificados apresentam melhores taxas de sobrevivência após o reaquecimento do que aqueles submetidos ao congelamento convencional (Almiñana & Cuello, 2015; Caamaño et al., 2016). Contudo, a aplicabilidade comercial dessa técnica depende da padronização de protocolos e da repetibilidade.

2.4.1 Vitrificação

A vitrificação é um método de criopreservação que causa a solidificação de líquidos em uma estrutura vítrea, sem formação de cristais de gelo, empregando altas concentrações de crioprotetores (Moisan, 2006). Esta técnica reduz a necessidade de equipamentos, sendo mais barata e rápida que o congelamento convencional (Dobrinisky, 2002). Entretanto, as células devem ser expostas por períodos muito curtos de tempo e em volumes mínimos de solução devido à alta concentração de crioprotetores (Vatja et al., 1998). Deste modo, apesar das células não sofrerem danos físicos causados pelo gelo, há maiores efeitos osmóticos e riscos de embriotoxicidade (Fahy & Wowk, 2015).

Para minimizar os danos causados durante a vitrificação, diferentes estratégias vêm sendo aplicadas em relação aos crioprotetores. De modo geral, opta-se pela utilização dos menos tóxicos, combinação de mais de uma molécula, volumes reduzidos, concentrações não tão altas e menor tempo de exposição (Vajta et al 1998; Dode et al., 2013; Fahy & Wowk, 2015).

Existem diferentes protocolos e ferramentas para a vitrificação, todas visando reduzir as concentrações e volume dos crioprotetores e aumentar a curva de resfriamento. Os recipientes de vitrificação são classificados em dois grupos. O primeiro é chamado de sistema aberto ou técnicas de superfície, que permitem taxas de resfriamento e aquecimento mais rápidas e contato direto com

o nitrogênio líquido. Já o sistema fechado, permite altas taxas de resfriamento, com a vantagem de ser mais seguro em relação a contaminações devido a não haver contato direto com o nitrogênio, além de ter maior facilidade de manuseio (Almiñana & Cuello, 2015). Diversos métodos foram desenvolvidos em ambas categorias, como o *open pulled straw* (OPS), cryotop, micropipetas, malhas de metal, entre outros.

A técnica mais utilizada para embriões bovinos PIV é a OPS, classificado como sistema aberto (Vajta et al., 1998; Dode et al., 2013). A técnica utiliza palhetas finas (250 μ L) de plástico amolecidas e esticadas manualmente na região central até redução do diâmetro a metade do original. Posteriormente, as palhetas são cortadas na extremidade estreita e 1 a 2 μ L do meio de vitrificação contendo embriões é introduzido nessa extremidade através do efeito capilar, e imediatamente imersa no nitrogênio líquido (Vajta et al., 1998).

Vieira et al. (2007) adaptou a técnica OPS, substituindo as palhetas de plástico por micropipetas de vidro (GMP, *glass micropipettes*) feitas de tubos capilares (1,5 mm) amolecidos por calor e esticados manualmente até o diâmetro de aproximadamente 0,6 mm. A GMP é uma alternativa interessante à OPS, especialmente pela redução de falhas durante aquecimento, já que não exige manipulação minuciosa. Para o aquecimento da GMP (Figura 4), após retirada do nitrogênio líquido e exposição ao ar por 3 s, a micropipeta é mergulhada em um tubo contendo solução de aquecimento. Posteriormente, o conteúdo do capilar é transferido à uma palheta para inovulação ou transferido a placas de cultivo *in vitro*.

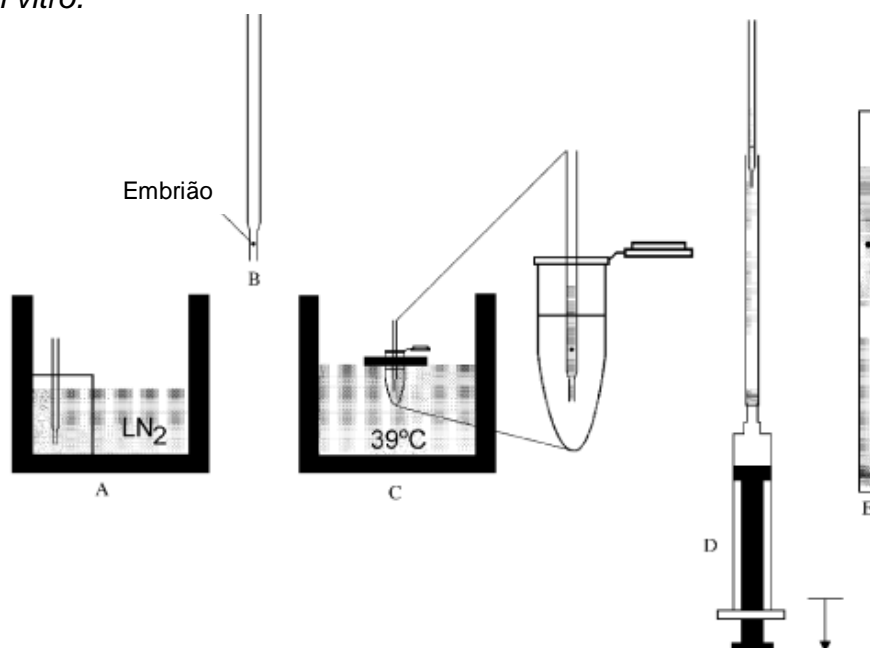


Figura 4. Técnica do *glass micropipettes* (GMP) de vitrificação de embriões bovinos. Etapas envolvendo o aquecimento e a diluição dos crioprotetores no capilar. A: GMP no nitrogênio líquido; B: GMP exposta ao ar; C: GMP mergulhada no tubo com meio de aquecimento; D: Transferência do conteúdo da GMP a uma palheta de 0,25 mL; E: Palheta contendo o embrião pronta para a inovulação. Fonte: Vieira et al. (2007).

De modo geral, diversas técnicas de vitrificação foram desenvolvidas nos últimos anos buscando reduzir os danos causados aos embriões para obter maior taxa de sobrevivência. Entretanto, o número insatisfatório de embriões viáveis e de boa qualidade após a criopreservação ainda é um dos problemas pelo qual a utilização da técnica de vitrificação ainda é limitada, sendo extremamente relevantes estudos que visem aumentar a criotolerância de embriões bovinos para a melhoria da eficiência das biotecnologias reprodutivas.

3. HIPÓTESES E OBJETIVOS

3.1 Hipótese

A suplementação com β -mercaptoetanol nos meios de produção *in vitro* de embriões bovinos antes e/ou após a criopreservação promove o aumento da criotolerância e sobrevivência de blastocistos submetidos à vitrificação.

3.2 Objetivo geral

Aumentar a eficiência de produção *in vitro* de embriões bovinos, obtendo maior viabilidade pré- e pós-criopreservação pela suplementação de aditivos antioxidantes e/ou precursores nos meios de cultivo *in vitro*.

3.3 Objetivos específicos

a) Avaliar os efeitos da suplementação com β -mercaptoetanol no meio de cultivo *in vitro* sobre as taxas de clivagem, blastocisto e eclosão de blastocistos bovinos no Dia 7 de desenvolvimento.

b) Avaliar a criotolerância de blastocistos cultivados *in vitro* em meio suplementado com β -mercaptoetanol no meio de cultivo *in vitro*.

c) Avaliar as taxas de sobrevivência, eclosão e a qualidade morfológica de embriões após a vitrificação de blastocistos cultivados *in vitro* com a suplementação antes e/ou após a vitrificação com β -mercaptoetanol no meio de cultivo *in vitro*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Meios e reagentes químicos, e condições experimentais

Exceto quando indicado, todos os produtos utilizados nos experimentos foram provenientes da Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO, EUA). Todos os procedimentos foram realizados em laboratório com temperatura ambiente controlada entre 25 e 30°C.

4.2 Produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos

A PIV de embriões bovinos seguiu nossos procedimentos estabelecidos, adaptados de Vieira et al. (2007).

4.2.1 Maturação *in vitro* (MIV)

Ovários bovinos obtidos em abatedouros da região foram mantidos a 30°C em solução salina tamponada com fosfato (PBS), adicionada de penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (0,05 mg/mL), durante o transporte ao laboratório. O tempo entre a coleta e o processamento dos ovários teve uma duração de 2 a 8 h. Complexos *cumulus*-oócito (CCOs) foram aspirados de folículos de 2 a 8 mm de diâmetro e depositados no interior de tubos de centrífuga (15 mL). O sedimento dos tubos foi coletado com pipeta e depositado em placa de Petri (90 x 15 mm) para a pesquisa e seleção dos CCOs no próprio líquido folicular centrifugado, sob lupa estéreo-microscópica, sendo utilizados apenas oócitos com citoplasma homogêneo e totalmente envoltos por células do CCOs compactas. Os CCOs foram transferidos para a incubadora de cultivo em placas de quatro poços (Nunclon™, Roskilde, Dinamarca; Cat.176740) contendo de 25 a 50 estruturas por poço em 400 µL de meio de maturação, composto de TCM- 199 com sais de Earle, suplementado com 26,2 mM de NaHCO₃, 25 mM de HEPES, 0,2 mM de piruvato de sódio, 0,01 UI de FSH/mL (Folltropin - Bioniche, Canadá), 0,5 µg/mL de LH (Lutropin Bioniche, Canadá) e 10% de soro de égua em estro (SEE). A MIV foi realizada por 24 h à 39°C, 5% de CO₂ e umidade saturada.

4.2.2 Seleção dos espermatozoides

Os espermatozoides de um único touro *Bos taurus* foram selecionados pela técnica de *swim up* em meio TALP-Sperm suplementado com 6 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), mantido a 39°C, em banho-maria. Após 1 h de migração ascendente, o sobrenadante foi centrifugado por 5 min, e o *pellet* aspirado e diluído para obtenção de uma dose inseminante de 1 a 1,5 x 10⁶ espermatozoides/mL.

4.2.3 Fecundação *in vitro* (FIV)

Após a maturação, os CCOs foram depositados em 400 µL de meio TALP-Fert adicionado de 30 µg/mL de heparina, 30 µg/mL de penicilinamina, 15 µM de hipotaurina e 1 µM de epinefrina, em placas de quatro poços, com o mesmo número de estruturas da MIV. Os CCOs foram co-cultivados com os espermatozoides por 18 a 22 h (Dia 0), em incubadora a 38,5°C, 5% de CO₂ e umidade saturada. Após a fecundação (Dia 1), os prováveis zigotos foram

submetidos à agitação mecânica em meio TCM-HEPES por 1 min para remoção das células do *cumulus*.

4.2.4 Cultivo *in vitro* (CIV)

Imediatamente após o desnudamento, os prováveis zigotos foram cultivados em 400 μ L de meio SOFaaci (Holm et al., 1999) suplementado com 6 mg/mL de BSA sob óleo mineral, em placas de quatro poços, contendo de 25 a 50 estruturas por poço. Nas primeiras 24 h as placas foram cultivadas em 5% de CO₂ em ar. Após a avaliação das taxas de clivagem (Dia 2), as placas foram mantidas em bolsa impermeável (Bag-system; Vajta et al., 1997), com uma mistura gasosa contendo 90% de N₂, 5% de O₂ e 5% de CO₂ em incubadora a 38,5°C, umidade saturada até o Dia 7 de desenvolvimento, quando foram avaliadas as taxas de blastocisto, estágio e qualidade embrionária por morfologia segundo Stringfellow & Givens (2010), em Graus 1 (excelente e bom), 2 (regular), 3 (pobre) e 4 (degenerados).

4.3 Criopreservação de blastocistos

4.3.1 Vitrificação dos embriões

Para a criopreservação, foi realizada a técnica de vitrificação baseada na tecnologia OPS (*open pulled straw*), originalmente descrita por Vajta et al. (1998), e posteriormente modificada por Vieira et al. (2007). Utilizaram-se capilares de vidro aquecidos e estirados para a confecção de micropipetas (*glass micropipettes*, ou GMP).

Blastocistos de qualidade excelente ou boa (Graus 1) no Dia 7 de desenvolvimento foram submetidos à vitrificação, a qual foi realizada por meio da exposição dos embriões por 1 min a uma solução de equilíbrio (solução extracelular) composta de 10% de etileno glicol (EG) e 10% de propileno glicol (PRO) em PBS + 10% SEE, seguida de 20 s de exposição a uma solução de vitrificação (solução extracelular) composta de 20% de EG e 20% de PRO em PBS + 10% SEE, à temperatura ambiente (25°C). Os embriões foram envasados em grupos de três por GMP, as quais foram imersas em nitrogênio líquido, sendo mantidos por aproximadamente 30 min até o aquecimento.

4.3.2 Aquecimento e cultivo *in vitro* dos embriões pós-aquecimento

O aquecimento dos embriões foi realizado pela exposição das GMPs ao ar por 3 s, e em seguida mergulhadas em um tubo contendo 1,2 mL de solução de aquecimento (PBS + 10% SFB) com 0,30 M de sacarose por 5 min a 39°C. O conteúdo da GMP foi transferido a uma gota contendo a solução de aquecimento com 0,15 M de sacarose. Após 5 min, os embriões foram segregados homogeneamente em grupos, de acordo com o experimento, e colocados em cultivo *in vitro* em SOFaaci + 5% de SEE a 38,5°C, 5% CO₂ e umidade saturada por 72 h para avaliação da capacidade de re-expansão e eclosão *in vitro*, sendo considerados viáveis os que atingiram o estágio de blastocisto eclodido (BE). Os embriões eclodidos de cada tratamento foram

fixados em álcool etílico a 99% a 4°C para estimativa do número total de células pela coloração com *bisbenzimidida* (a seguir).

4.4 Estimativa do número total de células em embriões

Os blastocistos eclodidos de cada tratamento foram separados por dia de eclosão e classificação morfológica, conforme acima, e corados para estimar o número total de células. Para a contagem celular, após fixação em álcool etílico a 99% a 4°C por no mínimo 12 h, os embriões permaneceram por 10 min em 10 µg/mL de *bisbenzimidida* (Hoechst 33342), em álcool absoluto (99%), abrigados da luz. Em seguida, os embriões foram depositados em volume mínimo em uma gota de glicerol (10 µL) sobre uma lâmina, cobertos com uma lamínula, para serem visualizados sob luz UV em microscópio invertido de epifluorescência para a identificação e contagem dos núcleos celulares.

4.5 Delineamento Experimental

Experimento I: Efeito da adição de distintas doses de β-mercaptoetanol (βME) no meio de cultivo *in vitro* após a vitrificação e aquecimento de blastocistos no Dia 7 de desenvolvimento.

No Experimento I (Figura 5), testou-se o efeito antioxidante pós-criopreservação da suplementação de 50 ou 100 µM de βME no meio de cultivo *in vitro* pós-aquecimento (CPA) sobre a viabilidade de blastocistos bovinos de PIV vitrificados no Dia 7 de desenvolvimento. Selecionaram-se blastocistos no Dia 7 de desenvolvimento com excelente qualidade e homogeneidade morfológica para a criopreservação por vitrificação, conforme acima. Após o aquecimento, os embriões foram cultivados *in vitro* a 38,5°C, 5% CO₂ e umidade saturada por 72 h, após distribuição aleatória em três grupos:

G1 - Grupo Controle, sem suplementação de βME no meio de CPA;

G2 - Grupo 50-βME, com a suplementação de 50 µM de βME no meio de CPA; e

G3 - Grupo 100-βME, com a suplementação de 100 µM de βME no meio de CPA.

O Experimento I foi realizado em cinco repetições, com a avaliação da taxa de eclosão após 72 h de CPA.

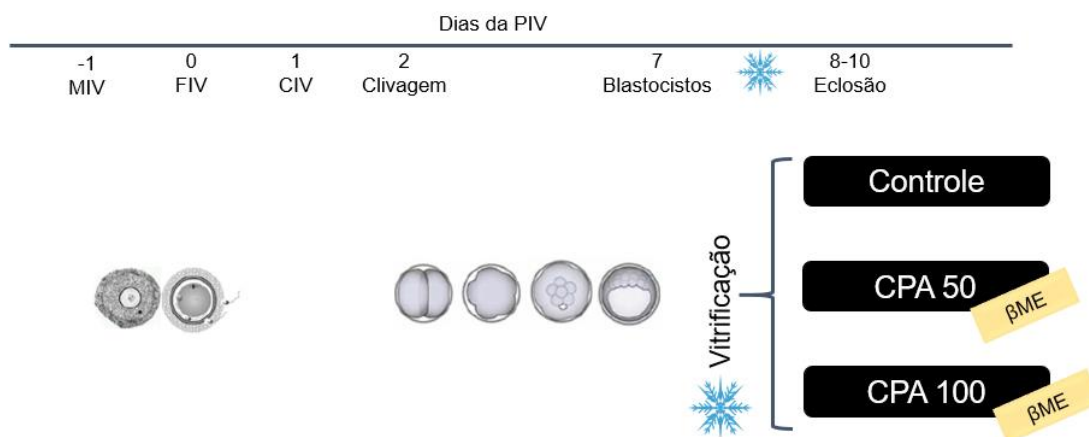


Figura 5: Desenho experimental do Experimento I.

Experimento II: Efeito do β ME na criotolerância de embriões e viabilidade pós-criopreservação.

No Experimento II (Figura 6), testou-se o efeito antioxidante antes e/ou após a criopreservação, pela suplementação de 100 μ M de β ME no meio de cultivo *in vitro* do Dia 1 ao Dia 7 de desenvolvimento (CIV), e/ou no meio de cultivo *in vitro* pós-criopreservação (CPA) sobre a criotolerância e viabilidade de blastocistos bovinos de PIV vitrificados no Dia 7 de desenvolvimento. Para tanto, imediatamente após o desnudamento (Dia 1) os prováveis zigotos foram segregados para cultivo *in vitro* utilizando ou não 100 μ M de β ME no meio de CIV até o Dia 7 de desenvolvimento. Selecionaram-se então blastocistos no Dia 7 de desenvolvimento, de cada grupo, com excelente qualidade e homogeneidade morfológica, para a criopreservação por vitrificação. Após o aquecimento, os embriões foram cultivados *in vitro* a 38,5°C, 5% CO₂ e umidade saturada por 72 h, utilizando ou não 100 μ M de β ME no meio de cultivo *in vitro* pós-aquecimento (CPA). Desta forma, formaram-se quatro grupos experimentais:

G1 - Grupo Controle, sem a suplementação com β ME, tanto no CIV quanto no CPA;

G2 - Grupo CPA, sem β ME no CIV e com suplementação de 100 μ M de β ME no CPA;

G3 - Grupo CIV, com a suplementação de 100 μ M de β ME no CIV e sem β ME no CPA; e

G4 - Grupo CIV/CPA, com a suplementação de 100 μ M de β ME no CIV e 100 μ M de β ME no CPA.

O Experimento II foi realizado em seis repetições, sendo avaliadas as taxas de clivagem (Dia 2), blastocisto (Dia 7), reexpansão após 12 h, e eclosão após 72 h de CPA, além da qualidade morfológica e número total de células em blastocistos eclodidos entre os grupos.

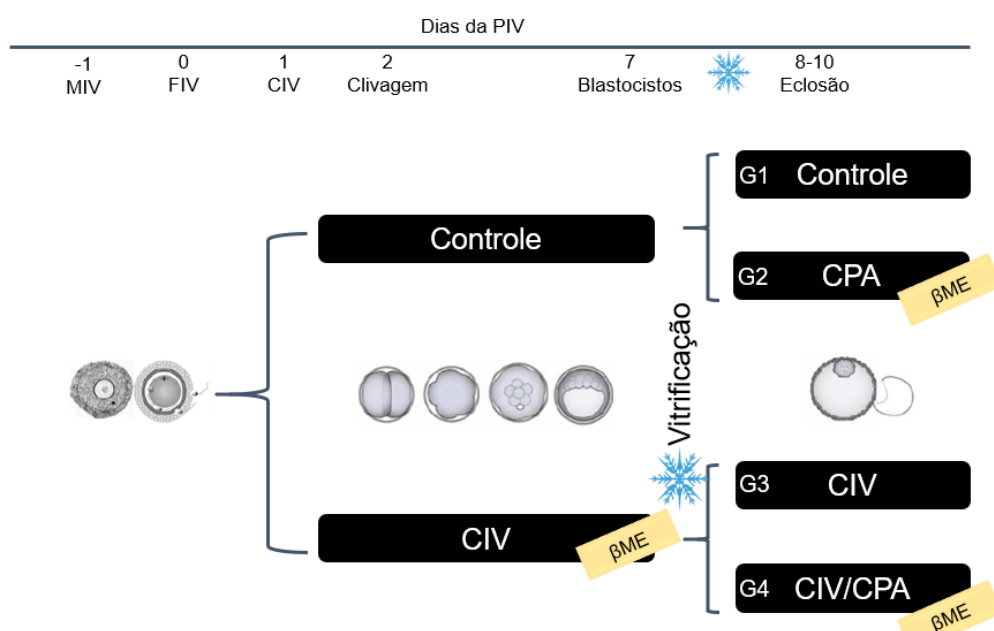


Figura 6: Desenho experimental do Experimento II.

4.6 Análise estatística dos dados

As taxas de clivagem e blastocisto, e qualidade morfológica embrionária, e as taxas de expansão e de eclosão após 72 h de cultivo pós-aquecimento, foram comparadas entre grupos nos experimentos pelo teste de χ^2 para $P < 0,05$. Os valores da contagem celular foram submetidos à análise de variância e comparação de médias entre grupos pelo teste de Tukey (Minitab®, State College, EUA).

5. RESULTADOS

Experimento I: Efeito da adição de distintas doses de β -mercaptoetanol (β ME) no meio de cultivo *in vitro* após a vitrificação e aquecimento de blastocistos no Dia 7 de desenvolvimento.

Foram utilizados neste experimento 191 embriões vitrificados segregados em três grupos: Controle (meio SOF sem suplementação de β ME), 50- β ME (meio SOF suplementado com 50 μ m de β ME) e 100- β ME (meio SOF suplementado com 100 μ m de β ME). As taxas de eclosão (Tabela 1) do Grupo 100- β ME (66,7%) foram superiores ao grupo Controle (47,7%), não diferindo do Grupo 50- β ME (52,4%). Observou-se um efeito benéfico, dose-dependente, da adição de β ME no meio de cultivo de embriões previamente vitrificados ($r=0,96$; $P<0,05$), em relação à taxa de eclosão, sendo a concentração de 100 μ M a que proporcionou os melhores resultados (Tabela 1).

Tabela 1. Taxa de eclosão de blastocistos bovinos submetidos a vitrificação e aquecimento, cultivados em meio SOF (Controle), suplementado com 50 μ m de β ME (50- β ME) ou 100 μ m de β ME (100- β ME)

Grupo	Cultivados		Taxa de eclosão	
	n	n	n	%
Controle	65	31	31	47,7 ^b
50- β ME	63	33	33	52,4 ^{ab}
100- β ME	63	42	42	66,7 ^a

^{a,b}: Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($P<0,05$).

Experimento II: Efeito do β ME na criotolerância de embriões e viabilidade pós-criopreservação.

Efeito do β ME no CIV. Com base no Experimento anterior, foi definido para o Experimento II a dose de 100 μ m de β ME. Foram utilizados 3735 oócitos segregados inicialmente em dois grupos: Controle (sem β ME no CIV) e β ME (100 μ m de β ME no CIV), sendo os resultados de taxas de clivagem (Dia 2), taxas de blastocisto (Dia 7) e qualidade embrionária apresentados na Tabela 2. A adição de β ME no meio de CIV não proporcionou maior taxa de clivagem em relação ao controle (81,1% vs. 80,2%, respectivamente). No entanto, a suplementação com β ME interferiu negativamente no desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocistos em relação ao grupo Controle (28,0% vs. 43,8%, respectivamente), sem comprometer a qualidade embrionária.

Tabela 2. Taxas de clivagem, blastocisto e qualidade embrionária após o cultivo em meio suplementado (β ME) ou não (Controle) com 100 μ m de β ME durante o cultivo *in vitro* (CIV)

Grupo	Cultivados		Taxa de Clivagem		Taxa de Blastocistos		Qualidade embrionária %	
	n	n	%	n	%	Grau 1	Grau 2	
Controle	1858	1491	80,2	813	43,8*	93,4	6,6	
β ME	1877	1522	81,1	525	28,0	93,1	6,9	

*na mesma coluna indica diferença significativa ($P < 0,05$)

Além da menor taxa de blastocistos, a suplementação do meio de CIV com β ME comprometeu a cinética de desenvolvimento até o estágio de blastocisto no Dia 7, com uma menor proporção de embriões em estágio mais avançados (blastocistos expandidos, em eclosão ou eclodidos) em comparação ao grupo Controle (218/525, 41,5% vs. 484/813, 59,5%, respectivamente), conforme ilustrado na Figura 7, indicando que o grupo β ME também causou um retardo de desenvolvimento em relação ao grupo Controle.

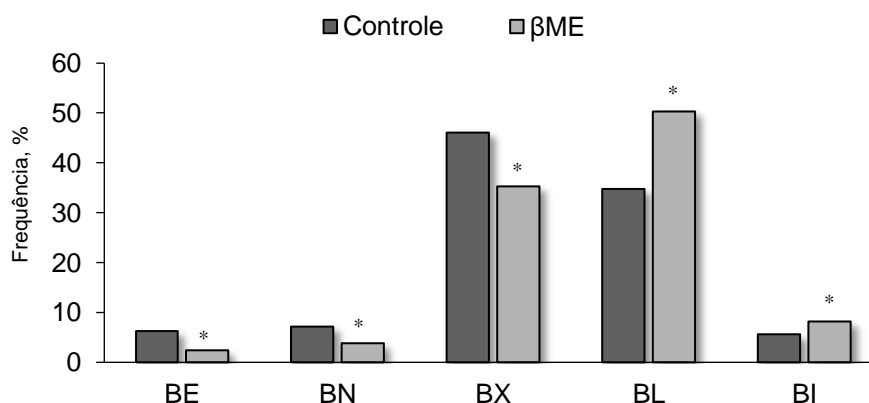


Figura 7. Distribuição dos diferentes estágios de desenvolvimento embrionário no Dia 7 de cultivo *in vitro* nos grupos Controle e β ME. *indica diferença significativa ($P < 0,05$). BE: Blastocisto eclodido; BN: Blastocisto em eclosão; BX: Blastocisto expandido; BL: Blastocisto; BI: Blastocisto inicial.

Efeito do β ME no CIV/CPA. Após a avaliação no Dia 7, os blastocistos dos grupos Controle e β ME foram vitrificados e aquecidos. Após o aquecimento, um total de 347 blastocistos com morfologia *normal*, ou seja, que não apresentavam retração, degeneração ou morte, foram segregados em dois sub-grupos, contendo ou não β ME no meio de cultivo pós aquecimento (CPA), totalizando quatro grupos experimentais: Controle (sem suplementação de β ME), CPA (β ME somente no cultivo pós-aquecimento), CIV (β ME apenas no cultivo *in vitro* prévio à vitrificação) e CIV/CPA (β ME no cultivo *in vitro* antes da vitrificação e após o aquecimento). Os grupos foram avaliados pelas taxas de reexpansão e eclosão e pelo número total de células nos blastocistos eclodidos, por grupo.

Os dados apresentados na Tabela 3 demonstram que a utilização de β ME durante o cultivo *in vitro*, com ou sem suplementação no CPA aumentou a taxa de reexpansão (grupos CIV, 84,0% e CIV/CPA, 87,5%) quando

comparados ao grupo Controle (71,0%), não diferindo do grupo CPA (73,1%), o qual foi também semelhante ao controle.

Em relação à taxa de eclosão (Tabela 3), a utilização de β ME após o aquecimento determinou um incremento no número de blastocistos eclodidos, independente da suplementação no CIV (grupos CPA, 58,1% e CIV/CPA, 63,8%) quando comparado ao grupo controle (36,6%) e grupo CIV (42,0%). Ao observar-se a taxa de eclosão por período a intervalos de 24 h (Figura 8), verificou-se que a diferença entre os tratamentos ocorreu entre 24 h e 48 h de cultivo, sendo os grupos CPA (31,5%) e CIV/CPA (31,4%) superiores quando comparados com o grupo controle (23,5%) e CIV (11,8%), demonstrando uma maior viabilidade embrionária pós-aquecimento quando o meio de CPA foi suplementado com β ME, independente da suplementação no CIV.

Tabela 3. Taxa de reexpansão e eclosão de blastocistos bovinos tratados com β ME somente durante o cultivo pós-aquecimento (CPA), somente durante o cultivo *in vitro* prévio a vitrificação (CIV), em ambos os momentos (CIV/CPA) ou em nenhum momento (Controle)

Grupo	n	Taxa de reexpansão 12 h		Taxa de eclosão total	
		n	%	n	%
G1 Controle	93	66	71,0 ^c	34	36,6 ^b
G2 CPA	93	68	73,1 ^{bc}	54	58,1 ^a
G3 CIV	81	68	84,0 ^{ab}	34	42,0 ^b
G4 CIV/CPA	80	70	87,5 ^a	51	63,8 ^a

^{a,b}: Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (P<0,05).

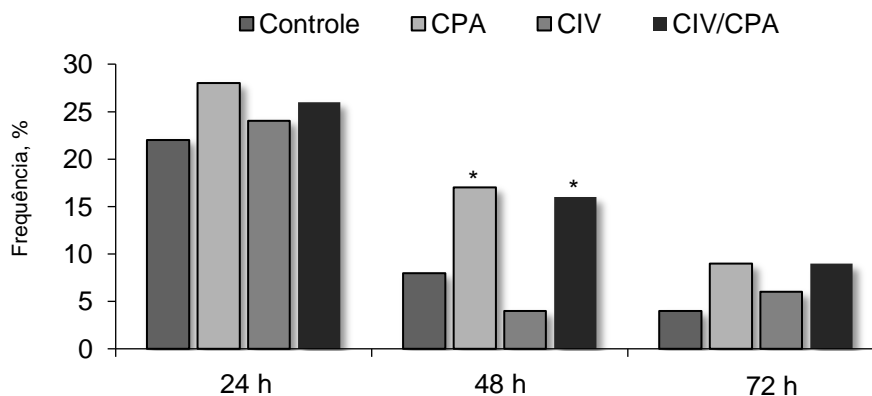


Figura 8. Taxa de eclosão de blastocistos bovinos após cultivo *in vitro* pós-vitrificação por 72 h, tratados com β ME somente durante o cultivo pós-aquecimento (CPA), somente durante o cultivo *in vitro* prévio a vitrificação (CIV), em ambos os momentos (CIV/CPA) ou em nenhum momento (Controle). *indica diferença significativa (P<0,05)

Em relação ao número total de células nos blastocistos eclodidos, verificou-se que a presença de β ME durante o CIV e o CPA (grupo CIV/CPA, 181,2 \pm 7,4) aumentou o número total de células nos embriões vitrificados em

comparação ao grupo controle ($139 \pm 9,9$), com os grupos CIV ($159,9 \pm 9,2$), e CPA ($165,2 \pm 6,7$) sendo similares a todos os grupos (Figura 9).

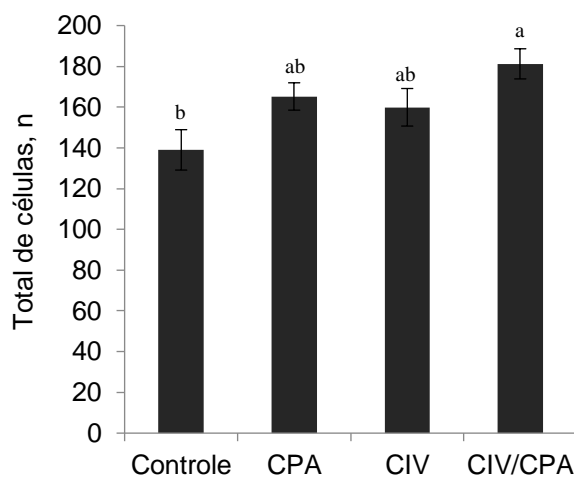


Figura 9. Número total de células em embriões eclodidos tratados com β ME somente durante o cultivo pós-aquecimento (CPA), somente durante o cultivo *in vitro* prévio à vitrificação (CIV), em ambos os momentos (CIV/CPA) ou em nenhum momento (Controle). ^{a,b}: Valores de média e erro padrão seguidos de letras diferentes diferem entre si, para $p < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

O estresse oxidativo possui efeitos negativos no desenvolvimento embrionário *in vitro* (Nars-Esfahani & Johnson, 1991; Deleuze et al., 2010), especialmente em embriões criopreservados, pois estes se tornam extremamente vulneráveis as crio-injúrias. A troca do meio intracelular e extracelular de água e crioprotetores causam danos intracelulares e de membrana, levando a peroxidação lipídica e problemas estruturais (Takahashi et al., 1996; Caamaño et al., 1998; Feugang et al., 2004; Nedambale et al., 2006).

A suplementação com antioxidantes/precursores provoca efeitos positivos durante a produção *in vitro* de embriões, especialmente os precursores da GSH, como o β ME (Takahashi et al., 1993; De Matos & Furnus, 2000; Chen et al., 2005). Em estudo realizado por Takahashi et al. (1993) verificou-se que a suplementação de β ME durante o CIV aumentou os níveis intracelulares de GSH, incrementando a taxa de blastocistos. Entretanto, o mecanismo de ação pelo qual o β ME exerce seu efeito sobre os embriões ainda não está completamente elucidado. Acredita-se que o β ME pode interagir diretamente com alguns radicais oxidados e pode quelar íons metálicos. Sua principal ação é proteger a cisteína (precursora do GSH) da oxidação em cistina e aumentar a absorção pela célula, desencadeando a síntese de GSH (Caamaño et al., 1998; Hosseini et al., 2009). Entretanto, dados sobre o efeito do β ME em embriões bovinos produzidos *in vitro* e vitrificados são escassos e os que existem apresentam resultados divergentes (Nedambale et al., 2006; Hosseini et al., 2009; Rocha-Frigoni et al., 2014). Neste estudo, visando avaliar os efeitos da suplementação do β ME na criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro*, encontramos resultados que sugerem que a utilização de β ME no meio de cultivo pós-aquecimento teve efeito benéfico, incrementando a taxa de eclosão de embriões bovinos vitrificados (Experimento I). Também foi observado que a utilização de β ME no meio de cultivo *in vitro* pré-vitrificação produziu embriões mais criotolerantes (Experimento II), e a utilização de β ME no cultivo pós-aquecimento, em combinação ou não, com a utilização no cultivo *in vitro*, melhorou as taxas de sobrevivência e qualidade embrionária (Experimento II).

Inicialmente realizamos um experimento para identificar a concentração ideal de β ME, já que na literatura há uma grande variação de concentrações, oscilando de 5 μ M a 500 μ M (De Matos et al., 1996; Caamaño et al., 1998; Geshi et al., 1999; Takahashi et al., 1993; Feugang et al., 2004). Estabeleceu-se 100 μ M de β ME como a concentração padrão, devido a maior taxa de eclosão observada no Experimento I, além de estudos prévios demonstrarem que 100 μ M promove adequado desenvolvimento embrionário (Caamaño et al., 1998; Nedambale et al., 2006).

Os resultados encontrados no Experimento II indicam que a suplementação de β ME durante o CIV não influenciou a taxa de clivagem (80,2% Controle vs. 81,1%, β ME), constatando-se que a adição de β ME somente no Dia 1 não é suficiente para interferir na primeira divisão celular. Em delineamentos experimentais similares ao nosso, Hosseini et al. (2009) e Rocha-Frigoni et al. (2013) também não verificaram interferência do β ME na taxa de clivagem. Porém, em nosso estudo, no Dia 7 do desenvolvimento verificou-se impacto negativo do β ME na taxa de blastocistos (Tabela 2) e na cinética de

desenvolvimento (Figura 7), com redução no número de embriões em estádios avançados em relação ao grupo controle. Embora tenhamos encontrado resultados semelhantes a Rocha-Frigoni et al. (2013) que obteve 33,4% de blastocistos no grupo tratado com 100 μ M β ME durante o CIV, contra 48,7% no grupo controle, a maioria dos estudos demonstram melhoras no desenvolvimento embrionário após a suplementação de β ME nos meios de cultivo (Takahashi et al., 1993; Caamaño et al., 1998; Geshi et al., 1999; Hosseini et al., 2009). Takahashi et al. (1993) verificou que as doses de 10 μ M e principalmente de 50 μ M de β ME incrementam as taxas de blastocistos (24,3% e 29,4%, respectivamente) vs. 7,1% no grupo controle. Do mesmo modo, Caamaño et al. (1998) observou que a taxa de blastocistos não diferiu entre os grupos que utilizam 10 ou 100 μ M de β ME (25,3% e 21,3%), mas que ambos são maiores que grupos cultivados em ausência do precursor de GSH (10,7%). Nos estudos de Geshi (1999), a concentração de 10 μ M de β ME foi mais efetiva que 50 μ M em condições de CO₂ reduzido (2%; 28,4% e 22,7%, respectivamente) vs. 15,4% no grupo controle. Já Hosseini et al. (2009), quando utilizaram 100 μ M de β ME no CIV, obtiveram maiores taxas de blastocisto em relação ao grupo controle (28,3% vs. 17,1%, respectivamente). Entretanto, mesmo com a maioria dos estudos demonstrando que o β ME incrementa as taxas de blastocistos, pode-se observar que os mesmos estudos apresentam taxas de blastocistos muito baixas no grupo controle, o que sugere que a suplementação de β ME durante o CIV é eficiente em condições de cultivo pouco favoráveis, sendo que quando a taxa superam as médias, como no presente estudo e no estudo de Rocha-Frigoni (2013), o β ME parece não ter efeito benéfico na concentração de 100 μ M.

Após a vitrificação e aquecimento, observou-se que apesar da redução inicial na taxa de blastocistos, os embriões que chegaram a este estágio apresentaram maior criotolerância, verificado pelo incremento na taxa de reexpansão do grupo β ME (84% no CIV, 87,5% no CIV/CPA vs. 71% no Controle e 73,1% no CPA; Tabela 3). No estudo de Hosseini et al. (2009), apesar de utilizarem a mesma concentração de β ME (100 μ M) no mesmo período (Dia 1 ao Dia 7) prévio a vitrificação, não observaram diferença nas taxas de reexpansão entre os tratamentos e o grupo controle. Presumimos que a diferença nos resultados seja decorrente do material heterogêneo oriundo dos abatedouros, das múltiplas metodologias com concentrações, períodos e protocolos de PIV e de vitrificação diferentes utilizados por cada laboratório.

Após 72 h de cultivo pós-aquecimento, verificou-se que os grupos tratados com β ME no cultivo pós-aquecimento apresentaram maior taxa de eclosão que aqueles que não utilizaram β ME ou que utilizaram somente no CIV (58,1%, CPA e 63,8%, CIV/CPA vs. 36,6%, Controle e 42,0%, CIV). Além disso, entre os blastocistos eclodidos, aqueles pertencentes ao grupo CIV/CPA apresentaram maior número de células que o grupo controle ($181,2 \pm 7,4$ vs. $139 \pm 9,9$, respectivamente), sugerindo que a utilização de β ME no meio de cultivo prévio à vitrificação e pós-aquecimento potencializa a taxa de sobrevivência e a qualidade dos embriões ao processo de vitrificação. Nedambale et al. (2006) também demonstraram que a suplementação de β ME se torna mais importante contra o estresse oxidativo quando realizada no meio CPA, verificando maior sobrevivência embrionária, eclosão e número total de células. Do mesmo modo,

Moussa et al. (2019), ao estudar o efeito da adição de β ME ao meio de CIV e CPA em embriões de búfalo, verificaram uma melhora na taxa de sobrevivência embrionária, eclosão, número total de células, além de proteção contra a apoptose.

É sabido que a concentração de lipídios no citoplasma embrionário aumenta durante o cultivo *in vitro*, possibilitando a ocorrência de peroxidação lipídica na membrana celular durante o cultivo, criopreservação e descongelamento/aquecimento. Contudo, sabe-se que a inibição da peroxidação lipídica melhora a viabilidade dos embriões após o congelamento/descongelamento (Nedambale et al., 2006), sendo o β ME, um composto importante para manter o balanço das EROs através do efeito antioxidante. Dessa forma o β ME favorece a sobrevivência celular após a vitrificação. Como verificado por outros autores (Takahashi et al., 1996; Feugang et al., 2004; Nedambale et al., 2006) e confirmado em nosso estudo, o β ME tem um papel crítico no aumento a resistência de embriões vitrificados ao estresse oxidativo. Observou-se o aumento os índices de criotolerância, com maior taxa de sobrevivência, eclosão e qualidade dos blastocistos vitrificados, principalmente quando o β ME foi utilizado após o aquecimento. Entretanto houve um efeito negativo na PIV dos embriões per se quando o β ME foi suplementado ao meio de CIV, sob as condições destes experimentos.

7. CONCLUSÕES

Experimento I:

A adição β ME no meio de cultivo de embriões vitrificados e aquecidos promoveu um efeito benéfico sobre a taxa de eclosão, sendo a concentração de 100 μ M a que proporcionou as melhores taxas de sobrevivência e desenvolvimento.

Experimento II

O uso do β ME durante o CIV gerou blastocistos mais criotolerâtes que aqueles não expostos ao β ME, indicado pela maior taxa de reexpansão após a vitrificação. Além disso, a suplementação de β ME durante o cultivo *in vitro* pós-aquecimento (CPA), em combinação ou não ao uso no cultivo *in vitro* prévio à vitrificação (CIV/CPA) aumentou as taxas de sobrevivência dos embriões ao processo de vitrificação, elevando as taxas de eclosão e incrementando o número total de células. Entretanto, a dose de 100 μ M de β ME no CIV causou uma redução na taxa de blastocistos em comparação ao grupo controle, com blastocistos em estádios mais tardios de desenvolvimento.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Aprimorar as técnicas de produção *in vitro* e de vitrificação de embriões bovinos, visando obter embriões em maior número e qualidade, é um desafio complexo e que envolve inúmeros fatores, principalmente a composição dos meios e a relação destes com a homeostase oxidativa.

Em nosso estudo, a adição de β ME, um precursor da GSH, nos meios de cultivo *in vitro* prévio à vitrificação e após o aquecimento aumentou a criotolerância e a qualidade de embriões bovinos produzidos *in vitro* e vitrificados, possivelmente por ter reduzido os efeitos deletérios decorrentes do estresse oxidativo. Uma perspectiva prática para futuros estudos poderá também reavaliar as concentrações de β ME no CIV, buscando definir doses que não comprometam o desenvolvimento *in vitro* e a cinética até o estágio de blastocisto, ao mesmo tempo salvaguardando os efeitos benéficos do aumento da criotolerância observados no cultivo pós-aquecimento, também em presença de β ME na concentração de 100 μ M.

Como perspectivas, visando elucidar melhor a ação do β ME na criotolerância de embriões bovinos vitrificados, acreditamos que estudos em nível bioquímico e molecular sejam necessários, pois desta forma poderemos verificar os níveis de EROs, GSH, transcritos e proteínas importantes neste processo, conforme metodologias descritas por Cagnone & Sinard (2013), Assis et al. (2015) e Wang et al. (2014). Além disso, a inovulação de embriões de PIV submetidos à vitrificação e expostos ao β ME é imprescindível para verificar o impacto da suplementação do precursor de GSH na taxa de desenvolvimento *in vivo* e de nascimentos.

9. REFERÊNCIAS

AGARWAL, A. *et al.* Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. **Fertility and Sterility**, New York, v. 86, n. 3, p. 503-12, 2006.

AGARWAL, A.; DURAIRAJANAYAGAM, D.; PLESSIS, S. S. Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, London, v. 12, n. 112, p. 1-19, 2014.

ALMIÑANA, C.; CUELLO, C. What is new in the cryopreservation of embryos? **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 12, n. 3, p. 418-427, 2015.

ANDERSON, M. E. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 111-112, p. 1–14, 1998.

ASSIS, P. M. *et al.* System for evaluation of oxidative stress on in-vitro-produced bovine embryos. **Reproductive BioMedicine Online**, Amsterdam, v. 31, p. 577-580, 2015.

BARBOSA, K. B. *et al.* Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BERGENDI, L. *et al.* Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life Sciences**, Amsterdam, v. 65, n.18/19, p. 1865-1874, 1999.

BETTERIDGE, J. What is oxidative stress? **Metabolism**, Amsterdam, v. 49, n. 2, p. 3-8, 2000.

BIGARELLA, C. L.; LIANG, R.; GHAFFARI, S. Stem cells and the impact of ROS signaling. **Development**, Amsterdam, v. 141, p. 4206-4218, 2014.

BLONDIN, P.; COENEN, K.; SIRARD, M. A. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. **Journal of Andrology**, Nova Jersey, v. 18, n. 4, p. 454–60, 1997.

BESOUW, M. *et al.* Cysteamine: an old drug with new potential. **Drug Discovery Today**, Amsterdam, v. 18, n.15-16, p. 785-792, 2013.

CAAMAÑO, J. N.; RYOO, Z.Y.; YOUNGS, C. R. Promotion of development of bovine embryos produced *in vitro* by addition of cysteine and b-mercaptoethanol to a chemically defined culture system. **Journal of Dairy Science**, Amsterdam, v. 81, n. 2, p. 369-374, 1998.

CAGNONE, G. L. M.; SIRARD, M-A. Transcriptomic signature to oxidative stress exposure at the time of embryonic genome activation in bovine blastocysts. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 80, p. 297-314, 2013.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 48, n. 6, p. 749-762, 2010.

CHEESEMAN, K. H.; SLATER, T. F. An introduction to free radical biochemistry. **British Medical Bulletin**, Oxônia, v. 49, n.3, p. 481-493, 1993.

CHIAN, R.C. *et al.* High survival rate of bovine oocytes matured *in vitro* following vitrification. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 50, n. 6, p. 685–696, 2004.

CHEN, N. *et al.* Influence of cysteamine supplementation and culture in portable dry-incubator on the *in vitro* maturation, fertilization and subsequent development of mouse oocytes. **Theriogenology**, Los Altos, California, v. 63, p. 2300-2310, 2005.

DELEUZE, S.; GOUDET, G. Cysteamine supplementation of *in vitro* maturation media: A review. **Reproduction in Domestic Animals**, New Jersey, v. 45, p. 476–482, 2010.

DELEUZE, S. *et al.* Influence of cysteamine on *in vitro* maturation, *in vitro* and *in vivo* fertilization of equine oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, New Jersey, v. 45, n. 1, p. 1–7, 2010.

DE MATOS, D. G. *et al.* Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, Korea, v. 42, n. 4, p. 432-436, 1995.

DE MATOS, D. G. *et al.* Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. **Molecular Reproduction and Development**, Nova Jersey, v. 45, p. 451-457, 1996.

DE MATOS, D. G.; FURNUS, C. C. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine *in vitro* maturation on embryo development: effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cystine. **Theriogenology**, Los Altos, California, v. 53, n. 3, p. 761-771, 2000.

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

DODE, M. A. N.; LEME, L. O.; SPRÍCIGO, J. F. W. Criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 37, n. 2, p. 145-150, 2013.

FAHY, G. M.; WOWK, B. Principles of cryopreservation by vitrification. **Methods in Molecular Biology**, New York, v. 1257, p. 21-82, 2015.

FAHNING, M.L.; GARCIA, M. A. Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 29, p. 1-18, 1992.

FEUGANG, J-M. *et al.* Addition of b-mercaptoethanol or Trolox1 at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidant agents. **Theriogenology**, Los Altos, California, v. 61, p. 71-90, 2004.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H.; RINNA, A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Molecular Aspects of Medicine**, Amsterdam, v. 30, n.1-2, p. 1-12, 2009.

FURNUS, C. C. *et al.* Metabolic requirements associated with GSH synthesis during *in vitro* maturation of cattle oocytes, **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 109, n. 1-4, p. 88-99, 2008.

GAMALEY, I. A.; KLYUBIN, I. V. Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions. **International Review of Cytology**, Amsterdam, v. 188, p. 203-255, 1999.

GEORGE, F. *et al.* Freezing of *in vitro* produced bovine embryos in animal protein-free medium containing vegetal peptones. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 66, p. 1381-1390, 2006.

GESHI, M. *et al.* Improvement of *in vitro* co-culture systems for bovine embryos using a low concentration of carbon dioxide and medium supplemented with b-mercaptoethanol. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 51, p. 551-558, 1999.

GONÇALVES, M. C. *et al.* Criotolerância de oócitos e embriões bovinos maturados com líquido folicular e/ou B-mercaptoetanol. **Ciência Animal Brasileira**, Goiás, v. 16, n. 2, p. 205-2016, 2015.

GUEMRA, S. *et al.* *In vitro* maturation of bovine oocytes in medium supplemented with quercetin, and its effect on embryonic development. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Minas Gerais, v. 65, n. 6, p. 1616-1624, 2013.

GUÉRIN, P.; EL MOUATASSIM, S.; MENEZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 7, n. 2, p. 175-189, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. **Molecular Aspects of Medicine**, Amsterdam, v. 8, p. 89-193, 1985.

HALLIWELL, B.; CROSS, C. E. Oxygen -derived species: their relation to human disease and environmental stress. **Environmental Health Perspectives**, Durham, v. 102, p. 5-12, 1994.

HARA, H. *et al.* Microtubule assembly and *in vitro* development of bovine oocytes with increased intracellular glutathione level prior to vitrification and *in vitro* fertilization. **Zygote**, Cambridge, v. 22, p. 476-482, 2013.

HARVEY, A. J. The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 98, p. 113–128, 2007.

HOLM, P. *et al.* High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum proteins. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 52, p. 683–700, 1999.

HOSSEINI, S. M. *et al.* Antioxidant supplementation of culture medium during embryo development and/or after vitrification-warming; which is the most important? **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, Berlin, v. 26, p. 355-364, 2009.

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

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its Classification. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 224, p. 164-175, 2014.

MANDAWALA, A. A. *et al.* Cryopreservation of animal oocytes and embryos: Current progress and future prospects. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 86, p. 1637-1644, 2016.

MOISAN, A. E. **Vitrification and dehydration for the preservation of gametes**. 2006. 223 f. Dissertation (Doctor of Philosophy)- The Interdepartmental Program of Animal and Dairy Sciences, Louisiana State University, [Baton Rouge],2006.

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

NEDAMBALE, T. *et al.* Higher survival rate of vitrified and thawed *in vitro* produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with beta-mercaptoethanol. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 93, p. 61-75, 2006.

NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **Royal Society of Chemistry**, Reino Unido, v. 5, p. 27986-28006, 2015.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, Amsterdam, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

OLIVEIRA, A. T. D.; LOPES, R. F. F.; RODRIGUES, J. L. Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced *in vitro* with different

serum concentrations. **Reproduction in Domestic Animals**, New Jersey, v. 41, p. 129–136, 2006.

OTOI, T. *et al.* Developmental competence of frozen-thawed blastocysts from fair-quality bovine embryos cultured with b-Mercaptoethanol. **The Veterinary Journal**, Amsterdam, v. 159, n, 3, p. 282–286, 2000.

PEGG, D. E. Principles of cryopreservation. *In*: DAY J. G.; STACEY G.N. (ed.) **Cryopreservation and freeze-drying protocols**. 2nd. ed. Totowa, N.J.: Humana Press, c2007. p. 39-57. (Methods in Molecular Biology, 368).

PERSSON, T.; POPESCU, B. O.; CEDAZO-MINGUEZ, A. Oxidative stress in alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, New York, v. 2014, p 1-11. 2014.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Amsterdam, v. 97, p. 55-74, 2015.

PRENTICE, J. R.; ANZAR, M. Cryopreservation of Mammalian oocyte for conservation of animal genetics. **Veterinary Medicine International**, New York, v. 2011, p. 1-11, 2011.

RIBEIRO, L. M. C. Radicais livres do oxigênio em medicina: (1º parte). **Acta Médica Portuguesa**, Lisboa, v. 2, p. 93-102, 1989.

RIBEIRO, S. M. R. *et al.* A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

RIZOS, D. *et al.* Consequences of Bovine Oocyte Maturation, Fertilization or Early Embryo Development *In vitro* Versus *In vivo*: Implications for Blastocyst Yield and Blastocyst Quality. **Molecular Reproduction and Development**, Nova Jersey, v. 61, p. 234-248, 2002.

ROCHA-FRIGONI, N. A. S. *et al.* Reduced levels of intracellular reactive oxygen species and apoptotic status are not correlated with increases in cryotolerance of bovine embryos produced *in vitro* in the presence of antioxidants. **Reproduction, Fertility and Development**, Clayton South, v. 26, p. 797-805, 2014.

ROVER JÚNIOR, L.; HOEHR, N. F.; VELLASCO, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p 112-119, 2001.

SAGARA, J.; MIURA, K.; BANNAY, S. Cystine uptake and glutathione level in fetal brain cells in primary cultura and in suspension. **Journal of Neurochemistry**, Nova Jersey, v. 61, n. 5, p. 1667- 1671, 1993.

SARTORI, R. *et al.* Update and overview on assisted reproductive technologies (ARTs) in Brazil. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 13, n. 3, p. 300-312, 2016.

SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radical Biology & Medicine**, Amsterdam, v. 30, n. 11, p. 1191-1212, 2001.

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

SIES, H.; CADENAS, E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, Londres, v. 311, p. 617-631, 1985.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, Nova Jersey, v. 82, p.291-295, 1997.

SIES, H. **Oxidative stress**. London: Academic, 1985. 507 p.

STRINGFELLOW, D. A.; GIVENS, M. D. **Manual of the International Embryo Transfer Society (IETS)**. 4th ed. Champaing: IETS, 2010.

TAKAHASHI, M. *et al.* Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos. **Biology of Reproduction**, Oxford, v. 49, p. 228-232, 1993.

TAKAHASHI, M. *et al.* Promoting effect of b-mercaptoethanol on *in vitro* development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos. **Biology of Reproduction**, Oxford, v. 6, p. 562-567, 2002.

TAKAHASHI, M. Oxidative stress and redox regulation on *in vitro* development of mammalian embryos. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 58, n. 1, p. 1-9, 2012.

UFER, C. *et al.* Redox control in mammalian embryo development. **Antioxidants & Redox Signaling**, New York, v. 13, n. 6, p. 836-875, 2010.

VAJTA, G. *et al.* The submarine incubation system, a new tool for *in vitro* embryo culture: a technique report. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 48, p. 1379-1385, 1997.

VAJTA, G. *et al.* Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 51, p. 53-8, 1998.

VAJTA G. *et al.* Vitrification in ART: myths, mistakes, disbeliefs and confusion. **Reproductive BioMedicine Online**, Amsterdam, v. 12, p. 779–796, 2009.

VIANA, J. 2017 statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. **Embryo Technology Newsletter**, Champaign, v. 36, n. 4, p. 8-25, 2018.

VIEIRA, A. D. *et al.* In-straw cryoprotectant dilution of IVP bovine blastocysts vitrified in hand-pulled glass micropipettes. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 99, p. 377–383, 2007.

WANG, F. *et al.* Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, Amsterdam, v. 101, n. 2, p. 577-586, 2014.

WILMUT I, ROWSON, L. E. The successful low-temperature preservation of mouse and cow embryos. **Journal of reproduction and fertility**, Amsterdam, v. 33, n. 2, p. 352-353, 1973.

ZHANG, H.; FORMAN, H. J.; CHOI, J. Y-Glutamyl transpeptidase in glutathione biosynthesis. **Methods in Enzymology**, Amsterdam, v. 401, p. 468-483, 2005.

10. VITA

Karine de Mattos, filha de Eliani Maria Bandeira e Flavio Joel de Mattos, nascida na cidade de Condor, Rio Grande do Sul, Brasil, no dia 22 de agosto de 1993. Realizou o Ensino Fundamental nas escolas: Escola Municipal de 1º Grau Castelo Branco, Escola Municipal de Ensino Fundamental Dom Pedro I e Escola Estadual de Ensino Médio Agostinha Dill no município de Condor e Colégio Delta no Município de Aripuanã (MT). Em 2008 iniciou o Curso Técnico em Agropecuária concomitantemente com o Ensino Médio na Escola Estadual Técnica Celeste Gobbato em Palmeira das Missões (RS). No ano de 2011 ingressou no Curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) com período de intercâmbio sanduíche nos anos de 2013-2014 na Universidad de Zaragoza (Unizar), Espanha, durante 12 meses. No decorrer da graduação foi bolsista do Programa de Educação Tutorial PET-Veterinária, aluna de iniciação científica do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução (Biotech) e do Laboratório de Anatomia Animal e monitora de disciplinas nas áreas de Reprodução Animal e Anatomia Animal. Sob orientação da Professora Dr^a. Daniela dos Santos Brum e supervisão do Professor Dr. Marcelo Bertolini, em 2016, realizou o Estágio Curricular Obrigatório no Laboratório de Embriologia e Biotécnicas da Reprodução na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) durante 3 meses. Em abril de 2017 ingressou no curso de Mestrado em Melhoramento e Genética Animal do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFRGS sob orientação do Professor Dr. Marcelo Bertolini, com período de mestrado sanduíche de 5 meses (2018-2019) na Université de Montreal (UdeM), Canadá, sob orientação do Professor Dr. Lawrence Smith.