

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**

Programa de Pós-Graduação em Veterinária



**TESE DE DOUTORADO**

**ANTIOXIDANTES NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE  
EMBRIÕES E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE  
OVINOS**

**Jorgea Pradieé**

**Pelotas/RS, 2013.**

**JORGEA PRADIEÉ**

**ANTIOXIDANTES NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES E  
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE OVINOS**

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

Orientador: Thomaz Lucia Jr.

Comitê de orientação: Lígia M. Cantarelli Pegoraro

Arnaldo Diniz Vieira

Rafael Gianella Mondadori

Pelotas, fevereiro/2013.

Dados de catalogação na fonte:

A large, empty rectangular box with a thin black border, positioned centrally below the text. It is intended for the user to enter cataloging data from the source.

**Banca examinadora:**

Prof. Dr. Thomaz Lucia Jr.

Profa. Dra. Mari Lourdes Bernardi

Profa. Dra. Carine Dahl Corcini

Prof. Dr. Gabriel Ribas Pereira

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

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

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

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

À minha família e aos amigos.

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

Dedico.

## **Agradecimentos**

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

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

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

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

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

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

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

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

*Muito obrigada!*

## Resumo

PRADIEE, Jorgea. **Antioxidantes na produção *in vitro* de embriões e criopreservação de sêmen de ovinos**. 2013. 68f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Estratégias da reprodução assistida que maximizem o potencial reprodutivo, como a produção *in vitro* de embriões (PIV) e a criopreservação de sêmen e embriões tem apresentado crescimento substancial nos últimos anos. Podendo ser associada à PIV, a criopreservação de embriões e sêmen, vem permitindo a maximização da eficiência reprodutiva, além da preservação do material genético tanto de animais de alto valor quanto de animais em risco de extinção. Visando mimetizar os sistemas enzimáticos específicos que atuam *in vivo*, antioxidantes estão sendo cada vez mais utilizados na PIV e na criopreservação de sêmen, na tentativa de diminuir os danos causados às células. Sobretudo danos estruturais, nos lipídeos da membrana plasmática, que são afetados pelos radicais livres e espécies reativas de oxigênio geradas principalmente pelas mitocôndrias. Sendo a integridade destas membranas biológicas pós-descongelamento imprescindível para funcionalidade dos espermatozoides criopreservados. Neste sentido, foram utilizadas as substâncias antioxidantes,  $\beta$ -mercaptoetanol (BME) e cisteína (CIS) na maturação e cultivo *in vitro* de embriões, e os mesmos antioxidantes associados ou não na criopreservação de sêmen ovino, visando otimizar os referidos processos. A CIS é um dos aminoácidos envolvidos na síntese de uma enzima com grande potencial redutor, a glutatona (GSH), porém é facilmente oxidada a cistina, o que impede sua atuação. O BME é um composto tiol de baixo peso molecular, que capta a cisteína para a célula, favorecendo as condições intracelulares para suportar a fecundação e o desenvolvimento embrionário. Na PIV, a utilização de 20 $\mu$ M BME isoladamente, não influenciou ( $P>0,05$ ) as taxas de clivagem (Controle: 70,0% e BME: 69,8%), porém reduziu ( $P<0,001$ ) as taxas de desenvolvimento embrionário (Controle: 5,2% e BME: 16,9%). No entanto quando utilizada a associação de 600  $\mu$ M CIS e 50  $\mu$ M BME, não trouxe prejuízo para clivagem (Controle: 60,3% e BME/CIS: 64,3%), nem para o desenvolvimento embrionário (Controle: 33,6% e BME/CIS: 36,6%). Já na criopreservação de sêmen, tanto a associação dos antioxidantes como seu uso isolado, não acarretou prejuízos ao sêmen.

Palavras-chave: Ovinos. Sêmen. Embriões. Antioxidantes.

## Abstract

PRADIEE, Jorgea. **Antioxidants in *in vitro* embryo production and sperm cryopreservation in ovines**. 2013. 68f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Strategies of assisted reproduction that maximize reproductive potential, such as *in vitro* embryo production (IVP) and cryopreservation of sperm and embryos, have widely spread over the last years. In association with IVP, sperm and embryo cryopreservation allows optimization of reproductive efficiency and also the preservation of genetic material of animals that either have high value or are in risk of extinction. Antioxidant solutions have been usually used in IVP and sperm cryopreservation to mimic specific enzymatic systems that occur *in vivo*, to minimize cell damages, especially structural damages in lipids present in plasmatic membranes, which are affected by freed radicals and oxygen reactive species generated by the mitochondria. As membrane integrity is crucial for post-thawing sperm viability, the antioxidants  $\beta$ -mercaptoethanol (BME) and cysteine were tested in the processes of cryopreservation of ram sperm and of *in vitro* maturation and culture of ovine embryos. Cysteine is one the amino acids involved in the synthesis of glutathione (GSH), which is an enzyme having great reducer potential. The BME is a low-molecular weight thiol compound that captures cysteine to the intracellular environment, favoring fecundation and embryo development. Post-thawing ram sperm viability was not affected by BME and cysteine, either alone or associated. In the IVP, the use of 20 $\mu$ M BME did not influence ( $P > 0.05$ ) cleavage rates (Control: 70.0% and BME: 69.8%), but it was associated with reduced ( $P > 0.001$ ) embryo development (Control: 16.9% and BME: 5.2%). However, with 600  $\mu$ M cysteine and 50  $\mu$ M BME, there was no reduction ( $P > 0.05$ ) in either cleavage (Control: 60.3% and BME/cysteine: 64.3%), or embryo development (Control: 33.6% and BME/Cysteine: 36.6%).

Keywords: Ovine. Semen. Embryo. Antioxidant.



## Lista de Figuras

- FIGURA 1 Taxa de re-expansão (24 h) e eclosão (48 h) por tratamento, durante cultivo suplementar *in vitro* após reaquecimento de embriões vitrificados.....56
- FIGURA 2 Taxa de re-expansão (24 h) e eclosão (48 h) por tratamento, durante cultivo suplementar *in vitro* após reaquecimento de embriões vitrificados.....57

## Lista de Tabelas

### **ARTIGO 1. Efeito antioxidante de $\beta$ -mercaptoetanol e cisteína sobre a viabilidade pós-descongelamento de sêmen de ovinos da raça Crioula Lanada**

- TABELA 1 Motilidade, integridade da membrana espermática (MEMB) e do acrossoma (ACR) e atividade mitocondrial (MIT) de sêmen ovino antes do congelamento por tratamento.....34
- TABELA 2 Motilidade, integridade da membrana (MEMB) e do acrossoma (ACR) e atividade mitocondrial (MIT) de sêmen ovino pós-descongelamento por tratamento.....35
- TABELA 3 Motilidade espermática de sêmen ovino em dois períodos pós-descongelamento por tratamento.....36
- TABELA 4 Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e capacidade antioxidante total (TOSC) de sêmen ovino pós-descongelamento por tratamento.....37

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

- TABELA 1 Taxas de clivagem, desenvolvimento embrionário até o oitavo dia após a inseminação (D8) e rendimento global nos tratamentos controle e BME.....54
- TABELA 2 Taxas de clivagem, desenvolvimento até o sétimo dia após a inseminação (D7) e rendimento global nos tratamentos controle e BME/CIS.....55

## Sumário

1 INTRODUÇÃO .....	11
2 OBJETIVOS .....	13
3 ARTIGOS .....	14
3.1 Artigo 1. EFEITO ANTIOXIDANTE DE $\beta$ -MERCAPTOETANOL E CISTEÍNA SOBRE A VIABILIDADE PÓS-DESCONGELAMENTO DE SÊMEN DE OVINOS DA RAÇA CRIOULA LANADA .....	14
Resumo .....	15
1. Introdução.....	16
2. Materiais e métodos.....	17
2.1 Processamento do sêmen e avaliações .....	18
2.2 Análises Bioquímicas .....	20
2.2.1 Espécies reativas de oxigênio (ROS) .....	20
2.2.2 Capacidade antioxidante total (TOSC) .....	21
4 Resultados .....	22
5 Discussão .....	23
6 Conclusão .....	25
3.2 Artigo 2 EFEITO DOS ANTIOXIDANTES $\beta$ -MERCAPTOETANOL E CISTEÍNA SOBRE A MATURAÇÃO E CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES OVINOS .....	38
Resumo.....	39
1. INTRODUÇÃO.....	39
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	42
2.1Primeiro experimento: BME na MIV e CIV de embriões ovinos .....	42
2.2 Segundo experimento: BME associado à CIS na MIV e CIV de embriões ovinos.....	44
2.3 Análise dos dados .....	44
3 RESULTADOS .....	44

4 DISCUSSÃO .....	45
5 CONCLUSÕES .....	47
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	58
5 REFERÊNCIAS GERAIS .....	60

## 1 INTRODUÇÃO

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

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

Visando mimetizar os sistemas enzimáticos específicos que atuam *in vivo*, antioxidantes estão sendo cada vez mais utilizados na PIV na tentativa de diminuir os danos causados às células (DE MATOS et al., 2002; BAI et al., 2008), sobretudo aos lipídeos da membrana plasmática, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, que alteram a estrutura, a integridade e fluidez das membranas biológicas (NIKI et al., 2009). A origem de tais injúrias se dá pelas

espécies reativas de oxigênio (ROS), produzidos principalmente pelas mitocôndrias (KOWALTOWSKI et al., 2009).

Conforme já descrito em outras espécies, (FURNUS et al., 2008; FUNAHASHI et al., 2005) a adição dos antioxidantes  $\beta$ -mercaptoetanol (BME) e cisteína (CIS) (BAI et al., 2008) aos meios de maturação *in vitro* (MIV) e cultivo *in vitro* (CIV) seria uma alternativa para minimizar tais prejuízos.

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

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

Neste sentido, os presentes experimentos tem o objetivo de utilização de substâncias antioxidantes na PIV e criopreservação de sêmen ovino visando à preservação do material genético.

## 2 OBJETIVOS

### A. Objetivo geral

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

### B. Objetivos específicos

- Determinar o efeito da adição de BME e CIS ao diluente de congelamento, na viabilidade pós-descongelamento do sêmen de ovinos da raça Crioula Lanada;
- Determinar a eficiência dos antioxidantes BME e CIS na MIV e CIV de embriões ovinos;
- Determinar a viabilidade de embriões ovinos produzidos *in vitro* em meio contendo BME e CIS, após vitrificação.

### **3 ARTIGOS**

#### **3.1 Artigo 1. EFEITO ANTIOXIDANTE DE $\beta$ -MERCAPTOETANOL E CISTEÍNA SOBRE A VIABILIDADE PÓS-DESCONGELAMENTO DE SÊMEN DE OVINOS DA RAÇA CRIOULA LANADA**

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

**Irá ser submetido à revista Ciência Rural**

(Formatado segunda as normas da revista Ciência Rural)



1 **EFEITO ANTIOXIDANTE DE  $\beta$ -MERCAPTOETANOL E CISTEÍNA SOBRE A**  
2 **VIABILIDADE PÓS-DESCONGELAMENTO SÊMEN DE OVINOS DA RAÇA**  
3 **CRIOULA LANADA**

4  
5 **EFFECT OF ANTIOXIDANT  $\beta$ -MERCAPTOETHANOL AND CYSTEINE**  
6 **POST ON THE FEASIBILITY OF SEMEN THAWING SHEEP BREED**  
7 **CRIOULA LANADA**

8  
9 **Resumo**

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

30  
31 **Abstract**

32 The objective of this study was to evaluate the effect of the inclusion of the  
33 antioxidants  $\beta$ -mercaptoetanol (BME) and cysteine in freezing extenders on the post-  
34 thawing ram sperm viability, considering that oxygen reactive species (ORS)  
35 generated from cellular components present in sperm are detrimental to sperm  
36 viability. Ejaculates were collected from four rams of the Crioula Lanada breed  
37 through an artificial vagina, twice a week, totaling 23 per ram. Ejaculates were  
38 pooled, including sperm from all four rams in the pools and subsequently split in six  
39 treatments: Control, with no antioxidant; 2mM BME; 5mM BME; 2mM BME and  
40 5mM cysteine; 5mM BME and 5mM cysteine; and 5mM cysteine. Sperm samples  
41 were diluted in tris-egg yolk-glycerol and stored in 0.25 mL straws containing  $100 \times$   
42  $10^6$  spermatozoa. Cooling and freezing were conducted in a TK3000 machine and  
43 thawing was done in water bath at 37°C for 20 s. Sperm motility, membrane  
44 integrity, acrosome integrity and mitochondrial functionality, both pre-freezing and

45 post-thawing did not differ among treatments ( $P > 0.05$ ). The amount of ORS and  
46 the total antioxidant activity were also similar across treatments ( $P > 0.05$ ). The  
47 inclusion of BME and cysteine at the tested concentrations had no influence on post-  
48 thawing sperm viability.

49

## 50 **1. Introdução**

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

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

70 Para otimizar os efeitos antioxidantes, sugere-se a disponibilização de precursores  
71 de glutathione (GSH), que é o principal antioxidante intracelular (LUBERDA, 2005).

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

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

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

94

## 95 2. Materiais e métodos

96 O experimento foi conduzido no Laboratório de Reprodução Animal do  
97 Departamento de Patologia da Faculdade de Veterinária – UFPel e no Laboratório de  
98 Reprodução Animal da EMBRAPA Clima Temperado, situados no município do Capão  
99 do Leão, Rio Grande do Sul. Os testes bioquímicos foram realizados no Laboratório de  
100 Bioquímica da Universidade Federal de Rio Grande (FURG).

101

## 102 **2.1 Processamento do sêmen e avaliações**

103 Quatro carneiros da raça Crioula Lanada, com idade entre 4 e 5 anos, foram utilizados  
104 como doadores de sêmen. Os carneiros foram mantidos sob as mesmas condições de  
105 manejo e alimentação, nas instalações da EMBRAPA Clima Temperado. As coletas de  
106 sêmen foram realizadas duas vezes por semana, através de vagina artificial, nos meses  
107 de janeiro a junho de 2012, totalizando 23 coletas.

108 Todos os indicadores de qualidade espermática foram avaliados antes do congelamento  
109 e após o descongelamento. Porém, a motilidade espermática continuou sendo avaliada  
110 durante duas horas após o descongelamento do sêmen. Após as avaliações pré-  
111 congelamento, somente foram processados para o restante do experimento, os  
112 ejaculados que apresentaram motilidade espermática maior ou igual a 70% e vigor  
113 espermática maior ou igual 3 (CBRA, 1998). A motilidade e o vigor foram avaliados  
114 com visualização em microscopia óptica em aumento de 200x, de uma alíquota de 5µl  
115 em uma lâmina coberta por lamínula, ambas previamente aquecidas a 37°C (BEARDEN  
116 & FUQUAY, 1997; CBRA, 1998).

117 A análise da morfologia espermática foi realizada em microscopia óptica de contraste de  
118 fase, sob lente de imersão com aumento de 1000 x. Para a avaliação da concentração  
119 espermática, o sêmen foi diluído em solução de formol salina na proporção de 1:400 e

120 avaliado em câmara de Neubauer sob microscopia óptica comum, em aumento de 200 x.  
121 Após a avaliação da concentração dos ejaculados, as amostras de sêmen dos quatro  
122 carneiros foram combinadas (*pool*), de modo que cada um contribuísse com a mesma  
123 concentração de espermatozoides viáveis ( $25 \times 10^6$  espermatozoides), totalizando  $1 \times$   
124  $10^9$  espermatozoides no *pool*. O diluente base utilizado para o congelamento do sêmen  
125 foi tris-gema-glicerol (Evans & Maxwell, 1987).

126 As amostras foram divididas em seis tratamentos, incluindo os antioxidantes BME e  
127 cisteína: T1, Controle, sem antioxidantes; T2, com 2mM BME; T3, com 5mM BME;  
128 T4, com 2mM BME e 5mM cisteína; T5, com 5mM BME e 5mM de cisteína; e T6, com  
129 5mM de cisteína. A curva de resfriamento/congelamento foi realizada em equipamento  
130 de congelamento automático (TK3000<sup>®</sup>, Uberaba, MG).

131 A integridade da membrana plasmática foi avaliada através de coloração fluorescente  
132 utilizando-se a combinação dos corantes diacetato de carboxifluoresceína (CFDA)  
133 (C4916, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) e Iodeto de Propídio (IP)  
134 (P4170, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) (HARRISON & VICKERS,  
135 1990), em microscópio de epifluorescência, com o filtro de excitação 450-490 nm, em  
136 aumento de 40 x, sendo avaliadas 200 células por lâmina. Os espermatozoides corados  
137 em verde eram considerados íntegros (membrana íntegra) e os corados de vermelho ou  
138 de verde e vermelho simultaneamente, eram classificados como não íntegros (membrana  
139 lesada).

140 Para a avaliação da integridade do acrossoma os espermatozoides eram corados com  
141 FITC-PNA (L7381, Sigma-Aldrich<sup>®</sup> Chemical Company (St. Louis, MI, EUA),  
142 utilizando a técnica de Kawamoto et al (1999), modificada. Foram contadas 200 células  
143 por lâmina, avaliadas em aumento de 1000 x, em microscópio de epifluorescência

144 (Olympus BX 51, América INC, São Paulo, SP), em filtro WU com excitações de 450-  
145 490nm e emissão de 520nm. Os acrossomas foram considerados íntegros quando  
146 apresentaram conformação normal e coloração verde e, quando apresentaram coloração  
147 vermelha e conformação diferente do normal, foram considerados lesados.

148 A avaliação da atividade mitocondrial foi realizada através de técnica descrita por  
149 Evenson et al. (1982), utilizando os corantes Rodamina 123 (Rh123) (R8004, Sigma  
150 Chemical Company, St. Louis, MO, USA) e iodeto de propídio. Foram contadas 200  
151 células por lâmina, avaliadas em aumento de 400x em microscópio de epifluorescência  
152 (Olympus BX 51, América INC, São Paulo, SP), em filtro WU com excitações de 450-  
153 490 nm e emissão de 516-617nm. As células que apresentavam a peça intermediária  
154 com uma intensa fluorescência verde foram consideradas com mitocôndrias integras  
155 (funcionalmente ativas), enquanto as células sem intensa fluorescência verde na peça  
156 intermediária foram consideradas não funcionais.

## 157 **2.2 Análises Bioquímicas**

### 158 **2.2.1 Espécies reativas de oxigênio (ROS)**

159 A mensuração das espécies reativas de oxigênio foi feita através de um teste de cinética  
160 realizado em fluorímetro (Victor 2, Perkin Elmer<sup>®</sup>), a partir de protocolo modificado de  
161 MYHRE & FONNUM (2001). Após o descongelamento do sêmen em banho-maria a  
162 37°C durante 30 s, o mesmo foi depositado em microtubos de 1,5 mL onde foi  
163 centrifugado por duas vezes a 800 G por 10 min com descarte do sobrenadante e  
164 ressuspensão do pellet com 1 mL de PBS livre de cálcio e magnésio. Foram retirados  
165 400 µl do volume e congelado para posterior análise da capacidade antioxidante total  
166 (TOSC). Foram então adicionados 600 µl do preparo da sonda fluorescente

167 2',7'-Diacetato de Diclorofluoresceína H2DCF-DA (40 $\mu$ M em PBS) (35845, Sigma  
168 Chemical Company, St. Louis, MO, USA) para ressuspensão do pellet, homogeneizado  
169 por 5 segundos em vórtex, permanecendo em incubação com a sonda por 30 min a  
170 36°C. Logo foi realizada a última centrifugação e lavagem com 600 $\mu$ l de PBS para  
171 retirada do excesso da sonda H2DCF-DA e posterior leitura no fluorímetro. Foram  
172 colocadas 160 $\mu$ l das amostras, em triplicatas, em placas brancas de 96 poços (Corning®  
173 3912). A leitura foi realizada em 12 ciclos com intervalo de 4 min e agitação de 2 s antes  
174 e depois de cada ciclo em uma temperatura de 36°C.

175 A geração de ROS foi determinada através da integração da área da curva de  
176 fluorescência pelo tempo, sendo os resultados expressos por  $UF \times 10^7$ .

### 177 **2.2.2 Capacidade antioxidante total (TOSC)**

178 Foi mensurada contra os radicais peróxidos, gerados pela decomposição térmica a  
179 36°C, de 2,2'-azobis (2-metilpropionamidina) dihidroclorato (ABAP), segundo  
180 AMADO et al. (2009). Para a realização do protocolo, uma alíquota de 500  $\mu$ L do  
181 sêmen descongelado foi armazenada a -18°C por no máximo 15 dias para posterior  
182 análise. No momento da análise, a alíquota foi descongelada a temperatura ambiente e  
183 sonicada por 5 segundos e, em seguida, centrifugada a 800 G por 10min, sendo o pellet  
184 desprezado. Em uma placa de 96 poços (Corning 3912) foi adicionado 125  $\mu$ L de  
185 tampão de reação (PBS), sendo acrescentado uma alíquota de 10  $\mu$ L de cada amostra em 4  
186 poços. Em dois poços foram acrescentados 7,5  $\mu$ L de água Milli-Q e nos outros dois, 7,5  
187  $\mu$ L de solução de ABAP (20  $\mu$ M), sendo as amostras feitas em duplicatas. Em seguida  
188 foram adicionados 10  $\mu$ L de solução da sonda H2DCF-DA (16  $\mu$ M) em todos os poços  
189 para leitura em fluorímetro durante 30min com intervalo de 5min em temperatura

190 controlada de 36°C, usando comprimentos de onda de excitação de 488 nm e um  
191 comprimento de onda de emissão de 529 nm.

192

### 193 **3.2.3 Análise estatística**

194 As respostas avaliadas antes e após congelamento foram: motilidade espermática;  
195 integridade da membrana espermática e do acrossoma; e atividade mitocondrial dos  
196 espermatozoides. Também foram realizados os testes de espécies reativas de oxigênio  
197 (ROS) e capacidade antioxidante total (TOSC) pós-descongelamento. As respostas,  
198 integridade de membrana e acrossoma antes do congelamento, foram comparadas entre  
199 os tratamentos por análise de variância, com comparação de médias pelo teste de Tukey.  
200 Nos demais casos, nos quais as respostas não apresentaram normalidade, segundo o teste  
201 de Shapiro-Wilk, foi utilizado um teste não paramétrico (análise de variância de  
202 Kruskal-Wallis). As análises estatísticas foram realizadas através do programa  
203 Statistix® (2008).

204

## 205 **4 Resultados**

206 As Tabelas 1 e 2 mostram os resultados das avaliações de qualidade seminal antes  
207 do congelamento e depois do descongelamento. Nenhuma das respostas diferiu entre os  
208 tratamentos ( $P > 0,05$ ).

209 A avaliação da motilidade espermática em dois períodos após o descongelamento  
210 (Tabela 3) indicou que os tratamentos não afetaram a sobrevivência das células durante  
211 este período ( $P > 0,05$ ).



212 Da mesma forma que as demais variáveis, as análises bioquímicas de ROS e  
213 TOSC, não apresentaram diferença entre os tratamentos ( $P>0,05$ ), conforme a Tabela 4.

214

## 215 **5 Discussão**

216 O presente trabalho é o primeiro que utiliza a associação entre os antioxidantes  
217 tióis, BME e cisteína, no congelamento de sêmen ovino, não sendo observada alteração  
218 na qualidade do sêmen descongelado.

219 Assim, o presente estudo assumiu a concentração de 5mM de cisteína (BUCAK  
220 et al., 2008) como a concentração ideal para ovinos, associando este ao BME, em duas  
221 concentrações diferentes, 2mM e 5mM, no congelamento de sêmen. Tais concentrações  
222 de BME foram determinadas em pré-experimentos, onde foi utilizada a concentração de  
223 7,5 mM e observado que apesar de não ter havido diferença estatística na motilidade  
224 espermática pós-descongelamento, essa concentração provocou redução na integridade  
225 de membrana (dados não publicados), indicando que esta concentração poderia interferir  
226 nas proteínas de membrana e assim diminuir a viabilidade espermática.

227 A associação de antioxidantes tióis, tais como, BME e cisteína vêm sendo  
228 estudada, principalmente em células (ISHII, et al 1981) e embriões (BAI et al, 2008;  
229 HOSSEINI et al, 2011), em várias espécies animais. Pela disponibilização destes  
230 precursores na formação de um dos principais antioxidantes intracelulares, a glutathione  
231 (GSH) (LUBERDA, 2005; BUCAK et al., 2007) demonstrando efeitos positivos, porém,  
232 no congelamento do sêmen ovino, conforme demonstrado pelos resultados, essa  
233 associação não demonstrou diferença.

234 Agentes tióis (BME e N-acetilcisteína) em concentração acima de 0,5mM  
235 permitiram a manutenção da motilidade em até 6h para sêmen descongelado de bovinos  
236 (BILODEAU et al.,2001), demonstrando que o BME foi tão bom antioxidante quanto a

237 cisteína e n-acetilcisteína, mantendo a motilidade mesmo em presença de estresse  
238 oxidativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), o que de alguma forma corrobora com os resultados obtidos no  
239 presente experimento, onde o tratamento contendo somente cisteína não difere dos  
240 tratamentos com BME em nenhum dos parâmetros estudados. No entanto, ainda que o  
241 contato dos antioxidantes com as células tenha sido maior, mostrou que as  
242 concentrações utilizadas não foram deletérias para as células espermáticas, porém não  
243 proporcionaram manutenção da motilidade após descongelamento.

244 Ainda que os antioxidantes tenham sido adicionados antes do período de  
245 resfriamento do sêmen, que caracteriza uma fase onde há uma maior produção de  
246 radicais livres, aumentando o desequilíbrio e consequentemente o estresse oxidativo  
247 (CHATERJEE et al., 2001), não houve ação benéfica dos mesmos.

248 A adição de BME ao sêmen, associado ou não a outra substância antioxidante,  
249 também é alvo de pesquisa em bovinos (BILODEAU et al., 2001; TALEVI et al., 2007),  
250 ovinos (SALEM et al., 1988) e suínos (YAMAGUCHI et al., 2012) porém com adição  
251 pós-descongelamento, aumentando o número de células funcionais e inibindo a  
252 capacitação espontânea (YAMAGUCHI et al., 2012). Porém, como já mencionado os  
253 antioxidantes foram adicionados antes do resfriamento, permanecendo em contato com  
254 as células durante todo período de resfriamento, congelamento e armazenamento; sendo  
255 talvez por este motivo que não tenham apresentado efeito benéfico.

256 Já em relação a cisteína utilizada isoladamente, ainda que diversos autores  
257 tenham comprovado sua ação positiva como antioxidante no sêmen de ovinos (BUCAK  
258 et al., 2008), bovinos (SARIOZKAN et al., 2009; BILODEAU et al., 2001 ) e suínos  
259 (FUNAHASHI & SANO, 2005; YAMAGUCHI et al., 2012), os resultados obtidos no  
260 presente experimento não demonstraram efeito aditivo.

261           Nos testes bioquímicos utilizados para quantificar ROS e TOSC, nenhum dos  
262 tratamentos foi capaz de exercer sua função.

263

264

265

## 266 **6 Conclusão**

267

268           A inclusão dos antioxidantes BME e cisteína, nas concentrações utilizadas, no  
269 diluente de congelamento para ovinos, isoladamente ou em associação, não promoveram  
270 benefícios para a qualidade seminal pós-descongelamento, não sendo capazes de reduzir  
271 os radicais livres nem aumentar a capacidade antioxidante total.

272

273

274

275

276

277

278           Aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pelotas, sob o  
279 número 5541.

280

281

## 282 **Agradecimentos:**

283 EMBRAPA Clima Temperado (Pelotas-RS).

284 EMBRAPA Pecuária Sul (Bagé-RS).

285

286 **7 Bibliografia**

287

288 AGARWAL, A. et al. Prevention of oxidative stress injury to sperm. **Journal of**  
289 **Andrology**, v.26, p.654-660, 2005. Disponível em: <  
290 [http://www.andrologyjournal.org/cgi/reprint/26/6/654?maxtoshow=&hits=10&RESULT](http://www.andrologyjournal.org/cgi/reprint/26/6/654?maxtoshow=&hits=10&RESULTFORMAT=&author1=Agarwal&searchid=1&FIRSTINDEX=0&volume=26&firstpage=654&resourcetype=HWCIT)  
291 [FORMAT=&author1=Agarwal&searchid=1&FIRSTINDEX=0&volume=26&firstpage](http://www.andrologyjournal.org/cgi/reprint/26/6/654?maxtoshow=&hits=10&RESULTFORMAT=&author1=Agarwal&searchid=1&FIRSTINDEX=0&volume=26&firstpage=654&resourcetype=HWCIT)  
292 [=654&resourcetype=HWCIT](http://www.andrologyjournal.org/cgi/reprint/26/6/654?maxtoshow=&hits=10&RESULTFORMAT=&author1=Agarwal&searchid=1&FIRSTINDEX=0&volume=26&firstpage=654&resourcetype=HWCIT)>. Acessado em: 05 fev. 2013. DOI:  
293 10.2164/jandrol.05016.

294

295 AMADO, L.L. et al. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy  
296 radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. **Science of**  
297 **the Total Environment**, v.407, p. 2115 – 2123, 2009. Disponível em: <  
298 <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.038> Acessado em: 05 fev. 2013. DOI:  
299 10.1016/j.scitotenv.2008.11.038>

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

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

309 BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. Semen evaluation. In: BEARDEN, H.J.; FUQUAY,  
310 J.W. **Applied Animal Reproduction**. 4th Ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997.p.159-  
311 170.

312 BRICARELLO, P. A. et al. Worm burden and immunological responses in Corriedale  
313 and Crioula Lanada sheep following natural infection with *Haemonchus contortus*.  
314 **Small Ruminant Research**, v. 51, p. 75-83, 2004. Disponível em:  
315 <[http://dx.doi.org/10.1016/S0921-4488\(03\)00188-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0921-4488(03)00188-3)>. Acessado em: 05 fev.2013. DOI:  
316 10.1016/S0921-4488(03)00188-3.

317 BILODEAU, J.F. et al. Thiols prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated loss of sperm motility in  
318 cryopreserved bull semen. **Theriogenology** v. 56, p. 275-286, 2001. Disponível em: <  
319 [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00562-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00562-3)>. Acessado em: 05 fev.2013. DOI:  
320 10.1016/S0093-691X(01)00562-3.

321 BYRNE, G.P. et al. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility *in*  
322 *vivo* and *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v.62, p. 265–275, 2000. Disponível  
323 em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00121-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00121-4)>. Acessado em: 05 fev. 2013.  
324 DOI: 10.1016/S0378-4320(00)00121-4.

325

326 BUCAK, M. N. et al. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram  
327 semen after the freeze–thawing process. **Small Ruminant Research**, v.75, p.128–134,  
328 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2007.09.002>>. Acessado  
329 em: 05 fev. 2013. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2007.09.002.

330

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

336

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

339

340 CHATTERJEE, S.; GAGNON, C. Production of reactive oxygen species by  
341 spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. **Molecular reproduction and**  
342 **development**, v.59, p.451-458, 2001. Disponível em:  
343 <<http://dx.doi.org/10.1002/mrd.1052>>. Acessado em: 05 fev. 2013. DOI:  
344 10.1002/mrd.1052.

345

346 COGNIÉ, Y. et al. Current status of embryo technologies in sheep and goat.  
347 **Theriogenology**, v.59, p.171-188, 2003. Disponível em:  
348 <[http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01270-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01270-0)>. Acessado em: 05 fev. 2013. DOI:  
349 10.1016/S0093-691X(02)01270-0.

350 EVANS, G. & MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of semen. In:\_\_\_\_. **Salamon's**  
351 **Artificial Insemination of sheep and goats**. Ed. Butterworths, 1987. Cap.14, p.122-  
352 139.

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

355 **Histochemistry and Cytochemistry**, v .30, p. 279-280, 1982. Disponível em:  
356 <<http://dx.doi.org/10.1177/30.3.6174566>> Acessado em: 05 fev. 2013. DOI:  
357 10.1177/30.3.6174566.

358

359 FUNAHASHI, H.; SANO,T. Select antioxidants improve the function of extended boar  
360 semen stored at 10°C. **Theriogenology**, v. 63, p.1605–1616, 2005. Disponível em:  
361 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.06.016>> Acessado em: 05 fev. 2013.  
362 DOI: 10.1016/j.theriogenology.2004.06.016.

363

364 HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane  
365 integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p.  
366 343-352, 1990. Disponível em:< <http://dx.doi.org/10.1530/jrf.0.0880343>> Acessado em:  
367 05 fev. 2013. DOI: 10.1530/jrf.0.0880343.

368

369 HOSSEINI, S. O. et al. Effect of culture condition and cell-permeable superoxide  
370 dismutase on levels of reactive oxygen species (ROS) production in “*in vitro*” produced  
371 sheep embryos. **Small Ruminant Research**,v. 97,p.88–93, 2011. Disponível em:  
372 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.02.010>>Acessado em: 05 fev. 2013. DOI:  
373 10.1016/j.smallrumres.2011.02.010.

374

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

378

379 KAWAMOTO, A. et al. Two-color fluorescence staining of lectin and anti-CD46  
380 antibody to assess acrosomal status. **Fertility and Sterility**, 71, 497-501,  
381 1999. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282\(98\)00507-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282(98)00507-X)>. Acessado  
382 em: 05 fev. 2013. DOI: 10.1016/S0015-0282(98)00507-X.

383

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

387

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

393

394 MYHRE, O.; FONNUM, F. The effect of aliphatic, naphthenic, and aromatic  
395 hydrocarbons on production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in  
396 rat brain synaptosome fraction: the involvement of calcium, nitric oxide synthase,  
397 mitochondria, and phospholipase A. **Biochemical Pharmacology**, n.62, p.119–128  
398 2001. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952\(01\)00652-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952(01)00652-9)>. Acessado  
399 em 05 fev. 2013. DOI: 10.1016/S0006-2952(01)00652-9.

400

401 PERIS, S.I. et al. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA  
402 integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. **Molecular**  
403 **Reproduction and Development**, v. 74, p.878–892, 2007. Disponível em:



404 <<http://dx.doi.org/10.1002/mrd.20686>>. Acessado em 05 fev. 2013. DOI:  
405 10.1002/mrd.20686.

406 RODRIGUEZ-GONZALEZ, E. et al. Effects on *in vitro* embryo development and  
407 intracellular glutathione content of the presence of thiol compounds during maturation  
408 of prepubertal goat oocytes. **Molecular reproduction and development**, v. 65, p.446–  
409 453, 2003. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/mrd.10316>>. Acessado em: 05  
410 fev. 2013. DOI: 10.1002/mrd.10316.

411 SARIÖZKAN, S. et al. The influence of cysteine and taurine on microscopic–oxidative  
412 stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation.  
413 **Cryobiology**, v. 58, p.134–138, 2009. Disponível em:  
414 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.11.006>>. Acessado em: 05 fev. 2013. DOI:  
415 10.1016/j.cryobiol.2008.11.006.

416

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

421

422 SICHERLE, C.C. et al. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in  
423 frozen-thawed ram semen supplemented with catalase or Trolox. **Small Ruminant**  
424 **Research**,v. 95, p.144–149, 2011. Disponível em:<  
425 <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.10.011>> Acessado em: 05 fev. 2013. DOI:  
426 10.1016/j.smallrumres.2010.10.011.

427

428 SINHA, M.P. et al. The effect of glutathione on the motility, enzyme leakage and  
429 fertility of frozen goat semen. **Animal Reproduction Science**, v.41, p.237-243, 1996.  
430 Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/0378-4320\(95\)01450-0](http://dx.doi.org/10.1016/0378-4320(95)01450-0)> Acessado em: 05  
431 fev. 2013. DOI: 10.1016/0378-4320(95)01450-0.

432

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

435

436 WATSON, P.F.. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal**  
437 **Reproduction Science**, v.60–61, p.481–492, 2000. Disponível em:  
438 <[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00099-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00099-3)> Acessado em: 05 fev. 2013. DOI:  
439 10.1016/S0378-4320(00)00099-3.

440

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

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

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

452 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.09.023>> Acessado em: 05 fev. 2013.

453 DOI: 10.1016/j.theriogenology.2011.09.023.

454

455 Tabela 1: Motilidade, integridade da membrana espermática (MEMB) e do acrossoma  
 456 (ACR) e atividade mitocondrial (MIT) de sêmen ovino antes do congelamento por  
 457 tratamento\*

Variáveis	Motilidade (%)	MEMB (%)	ACR (%)	MIT (%)
Controle	80,4 ± 0,4	74,9 ± 2,1	52,4 ± 3,2	74,9 ± 1,8
2mM BME	80,0 ± 0,6	74,2 ± 2,3	52,4 ± 3,8	79,7 ± 2,5
5mM BME	78,6 ± 0,9	73,4 ± 2,5	58,2 ± 4,3	78,7 ± 2,3
2mM BME + 5 mM Cisteína	80,4 ± 0,4	71,7 ± 2,3	47,6 ± 3,9	76,5 ± 2,4
5mM BME + 5 mM Cisteína	80,4 ± 0,4	76,0 ± 1,6	51,7 ± 3,4	79,8 ± 2,8
5 mM Cisteína	80,4 ± 0,4	74,0 ± 2,2	47,5 ± 3,7	77,5 ± 2,7

458 BME: β-mercaptoetanol

459 \*Médias ± EPM não diferiram (P > 0,05)

460

461 Tabela 2: Motilidade, integridade da membrana (MEMB) e do acrossoma (ACR) e  
 462 atividade mitocondrial (MIT) de sêmen ovino pós-descongelamento por tratamento

Variáveis	Motilidade (%)	MEMB (%)	ACR (%)	MIT (%)
Controle	31.3 ± 1.6	42.3 ± 3.7	40,9 ± 1,9	64,5± 3.0
2mM BME	25.6 ± 1.4	40.4 ± 3.8	35,9 ± 2,8	58,0± 2,9
5mM BME	25.9 ± 1.4	42.1 ± 4.8	38,8 ± 2,2	61,9± 2,8
2mM BME + 5 mM Cisteína	24.5 ± 1.6	45.1 ± 3.5	40,8 ± 3,3	55,3± 3,6
5mM BME + 5 mM Cisteína	26.0 ± 1.6	42.7 ± 2.9	45,6 ± 2,0	56,6± 3,8
5 mM Cisteína	23.9 ± 1.6	38.9 ± 4.0	44,1 ± 1,7	62,0± 3,4

463 BME: β-mercaptoetanol

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

465

466 Tabela 3: Motilidade espermática de sêmen ovino em dois períodos pós-  
 467 descongelamento por tratamento

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

468 BME:  $\beta$ -mercaptoetanol

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

470

471 Tabela 4: Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e capacidade antioxidante  
 472 total (TOSC) de sêmen ovino pós-descongelamento por tratamento

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

473 BME: β-mercaptoetanol

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

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

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

**Irá ser submetido à revista Ciência Rural**  
(Formatado segunda as normas da revista Ciência Rural)



1 **Efeito dos antioxidantes  $\beta$ -mercaptoetanol e cisteína sobre a maturação e cultivo *in***  
2 ***vitro* de embriões ovinos**

3 **Effect of antioxidant  $\beta$ -mercaptoethanol and cysteine on the maturation and *in***  
4 ***vitro* culture of sheep embryos**

5  
6 **Resumo**

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

24  
25 **Abstract**

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

41  
42 **1. INTRODUÇÃO**

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

48 Durante o cultivo *in vitro* (CIV), os embriões são submetidos a condições subótimas  
49 e assim a produção de ROS aumenta além dos níveis encontrados *in vivo*. Este  
50 desequilíbrio é chamado de “estresse oxidativo”, comprometendo o desenvolvimento e  
51 viabilidade embrionária (GUERIN et al., 2001).

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

55 Antioxidantes são agentes redutores, como compostos tióis de baixo peso molecular  
56 que induzem a síntese de glutathione (GSH) (DE MATOS et al., 2002; CHOE et al.,  
57 2010; HOSSEINI et al., 2011). A GSH é um tripeptídeo redutor ( $\gamma$ -glutamil-cisteinil-  
58 glicine), envolvido em vários mecanismos do metabolismo celular, como: transporte de  
59 aminoácidos; síntese de proteínas e de DNA; e proteção das células contra danos  
60 oxidativos. Durante os processos de maturação do oócito, fecundação e  
61 desenvolvimento embrionário *in vivo*, antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos estão  
62 presentes no líquido folicular, nos complexos *cumulus oophorus* (CCO) e nas secreções  
63 do trato reprodutivo controlando a ação de ROS e radicais livres (LIVINGSTON et al.,  
64 2009), ao contrário do que ocorre *in vitro*. A cisteína é um dos aminoácidos envolvidos  
65 na síntese de GSH no oócito (DE MATOS et al., 1996), mediada pelas células do CCO  
66 (DE MATOS et al., 1997). A disponibilidade de cisteína no meio de MIV parece ser  
67 limitante na síntese de GSH em oócitos de mamíferos. Em geral, a concentração de  
68 cisteína usada é menor do que a de cistina por causa da sua auto-oxidação (DE MATOS

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

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

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

90 No presente estudo, foram realizados dois experimentos. No primeiro  
91 experimento, foi testada a eficiência da suplementação dos meios de MIV e CIV com  
92 20 $\mu$ M de BME sobre as taxas clivagem e de desenvolvimento embrionário. No segundo,  
93 foi avaliado o efeito da adição da associação de BME e cisteína, também dos meios de

94 MIV e CIV, sobre as taxas de clivagem, desenvolvimento embrionário e de reexpansão  
95 após vitrificação.

96

## 97 **2. MATERIAL E MÉTODOS**

98

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

104

### 105 **2.1 Primeiro experimento: BME na MIV e CIV de embriões ovinos**

106

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

113

114 O meio de MIV foi constituído de TCM 199 acrescido de: soro inativado de ovelha  
115 em cio (20%); penicilina, 100 UI/ml; estreptomicina, 100 µg/ml; FSH, 5µg/ml; LH, 5  
116 µg/ml; estradiol, 1 µg/ml (BERLINGUER *et al.*, 2005). A MIV foi realizada em placas  
117 de quatro poços contendo gotas de 400 µl, cobertas com óleo mineral, durante 24 h em  
118 estufa a 39°C com atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> e umidade saturada. Após a MIV, os CCO  
foram inseminados com sêmen resfriado diluído (v/v) em tris-gema de ovo (EVANS &

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

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

## 144 **2.2 Segundo experimento: BME associado à CIS na MIV e CIV de embriões** 145 **ovinos**

146 Neste experimento, foram realizadas 10 rotinas de PIV com ovários de ovelhas  
147 púberes. Os ovários foram mantidos a 30°C em solução salina e antibiótico durante o  
148 transporte do frigorífico ao laboratório. Os CCO selecionados para MIV foram divididos  
149 em dois tratamentos: BME /CIS (n = 729), com meios de MIV e CIV incluindo BME  
150 (50µM) e cisteína (600µM); e Controle (n = 676), sem inclusão de antioxidantes nos  
151 meios de MIV e CIV. A MIV e a FIV foram realizadas conforme descrito no primeiro  
152 experimento. Após a FIV, os prováveis zigotos desnudados e cultivados por 8 dias em  
153 meio SOF (HOLM et al., 1991), com 0,4% BSA, em *bag system* com atmosfera de 3  
154 gases (5%CO<sub>2</sub>; 90%N<sup>2</sup> e 5%O<sup>2</sup>) (VAJTA et al., 1997), a 39°C.

155 Da mesma forma que o experimento anterior, foram avaliados os índices de  
156 partenogênese em cada rotina de PIV, bem como as taxas de clivagem, de  
157 desenvolvimento embrionário, rendimento global e de viabilidade pós-reaquecimento.  
158 As avaliações neste experimento foram realizadas em D7, em virtude do  
159 desenvolvimento mais acelerado dos embriões que foram cultivados sob atmosfera de 3  
160 gases.

## 161 **2.3 Análise dos dados**

162

163 Tanto no primeiro, como no segundo experimento, as taxas de clivagem, de  
164 desenvolvimento embrionário, e de reexpansão pós-reaquecimento foram comparadas  
165 entre os tratamentos pelo teste de qui-quadrado, software Statistix® (2008).

166

## 167 **3 RESULTADOS**

168

### 169 **3.1 Primeiro experimento: BME na MIV e CIV de embriões ovinos**

170 Os tratamentos Controle e BME apresentaram taxas de clivagem semelhantes  
171 ( $P>0,05$ ) (Tabela 1). Porém, a taxa de desenvolvimento embrionário até o estágio de  
172 blastocisto e rendimento global foi inferior no tratamento BME ( $P<0,001$ ). Não foi  
173 observada divisão partenogénica no presente experimento.

174 A taxa de viabilidade embrionária pós-vitrificação, não diferiu entre os tratamentos  
175 Controle e BME (Figura 1).

176

### 177 **3.2 Segundo experimento: BME associado à CIS na MIV e CIV de embriões** 178 **ovinos**

179 Das estruturas cultivadas e analisadas quanto à divisão partenogénica, a  
180 clivagem ocorreu em somente 2,1% no tratamento Controle (2/94) e 1,9% no tratamento  
181 BME/CIS (2/101). A comparação das respostas de interesse em função dos tratamentos  
182 é mostrada na Tabela 2.

183 A suplementação do meio de MIV e CIV com 50 $\mu$ M de BME e 600 $\mu$ M de CIS  
184 não apresentou efeito ( $P > 0,05$ ) sobre as taxas de clivagem, de desenvolvimento  
185 embrionário e de viabilidade de embriões de ovinos vitrificados (Figura 2).

## 186 **4 DISCUSSÃO**

187

188 O primeiro experimento partiu de uma concentração mais baixa de BME (20 $\mu$ M),  
189 pois segundo experimentos anteriores, concentrações maiores do que 50 $\mu$ M de BME  
190 tem efeito tóxico, podendo inibir e/ou desnaturar proteínas (TAKAHASHI et al., 1993;  
191 MORI et al., 2006). Ainda assim, alguns autores (DE MATOS et al., 1995; DE MATOS  
192 et al., 1997) citam que o BME induz a síntese de GSH intracelular quando adicionado na  
193 MIV, e que confere proteção contra danos oxidativos durante a maturação (LUBERDA,

194 2005). Além disso, concentrações inferiores a 50 $\mu$ M de BME promovem o  
195 desenvolvimento embrionário (TAKAHASHI et al.,1993). No entanto, esta baixa  
196 concentração de BME nas duas etapas de MIV e CIV de ovinos, não promoveu redução  
197 nas taxas de clivagem, porém reduziu a taxa de desenvolvimento embrionário.

198 Assim como relatado por DE MATOS et al. (2002), que mesmo comprovando a  
199 ação do BME sob a produção de GSH intracelular em oócitos ovinos, o mesmo não  
200 promoveu desenvolvimento embrionário, sugerindo a concentração inadequada na MIV  
201 ou outro efeito negativo não relacionado ao aumento dos níveis de GSH.

202 Talvez nossos resultados estejam relacionados com uma possível desnaturação de  
203 estruturas proteicas e enzimáticas, realizada pelo BME, uma vez que não foi associado à  
204 outra substância antioxidante como a CIS, cistina ou cisteamina (DE MATOS et al.,  
205 1997) e por ter sido adicionado nas etapas de MIV e CIV, provavelmente interferindo  
206 em rotas oxidativas importantes (KOWALTOWSKI et al., 2009).

207 Assim, com a intenção de incrementar as taxas de clivagem, desenvolvimento  
208 embrionário e viabilidade dos embriões ovinos vitrificados, no segundo experimento  
209 foram associados dois antioxidantes na concentração de 50 $\mu$ M de BME e 600 $\mu$ M de  
210 CIS, nas etapas de MIV e CIV. Visto que a associação destes antioxidantes demonstrou  
211 facilitar a absorção da CIS através do transporte da cistina (CIS reduzida) pelo BME  
212 melhorando a síntese de GSH (ISCHII et al., 1981).

213 Ao contrário do encontrado em estudos anteriores (DE MATOS et al., 2002), no  
214 presente experimento ambas as taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário não  
215 foram afetadas pelo uso destes antioxidantes, provavelmente influenciado pelas  
216 concentrações utilizadas.

217 O uso da associação de antioxidantes não comprometeram as taxas de clivagem e  
218 de desenvolvimento embrionário, evidenciando que podem ser incorporados no processo



219 após determinação das concentrações mais efetivas. Seria interessante um delineamento  
220 que mostrasse a ação da associação somente na maturação, somente no cultivo, na  
221 maturação e cultivo e um tratamento controle, comparando assim as taxas de maturação  
222 nuclear, clivagem e desenvolvimento embrionário.

223 No que se refere a vitrificação dos embriões, tanto no primeiro quanto no segundo  
224 experimento, ainda não é possível concluir sobre os dados, pelo reduzido número de  
225 estruturas vitrificadas.

## 226 **5 CONCLUSÕES**

227

228 No primeiro experimento a concentração utilizada de BME nas etapas de MIV e  
229 CIV, apesar de não ter reduzido a taxa de clivagem, reduziu a taxa de desenvolvimento  
230 embrionário.

231 A adição de BME e CIS, nas concentrações utilizadas não trouxe benefício para as  
232 taxas de produção embrionária *in vitro* em ovinos.

233

234

235 Aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pelotas, sob o  
236 número 5541.

237

## 238 **Agradecimentos**

239 EMBRAPA Clima Temperado

240 Frigorífico Marfrig

241

242

243 **6 BIBLIOGRAFIA**

244

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

250

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

256

257 CHOE, C. et al. Synergistic effects of glutathione and b-mercaptoethanol treatment  
258 during *in vitro* maturation of porcine oocytes on early embryonic development in a  
259 culture system supplemented with L-cystine. **Journal of Reproduction and**  
260 **Development**, v.56, n.6, p.575-582, 2010. Disponível em: <  
261 <http://dx.doi.org/10.1262/jrd.09-214H>>. Acessado em: 05 fev. 2013. DOI:  
262 10.1262/jrd.09-214H.

263

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

267 [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00278-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00278-2)>. Acessado em: 05 fev. 2013. DOI:  
268 10.1016/S0093-691X(99)00278-2.

269

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

275

276 DE MATOS, D. et al. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental  
277 capacity of bovine oocyte matured *in vitro*. **Molecular Reproduction and**  
278 **Development**, v. 42, p.432-436, 1995. Disponível em:<  
279 <http://dx.doi.org/10.1002/mrd.1080420409>>. Acessado em: 05 fev. 2013. DOI:  
280 10.1002/mrd.1080420409.

281

282 DE MATOS, D. et al. Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured and its  
283 effect on embryo development and freezability. **Molecular Reproduction and**  
284 **Development**, v.45, p.451-457, 1996. Disponível em:  
285 <[http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199612\)45:4<451::AID-MRD7>3.0.CO;2-](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199612)45:4<451::AID-MRD7>3.0.CO;2-Q)  
286 [Q](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199612)45:4<451::AID-MRD7>3.0.CO;2-Q)> Acessado em: 05 fev. 2013. DOI: 10.1002/(SICI)1098-  
287 2795(199612)45:4<451::AID-MRD7>3.0.CO;2-Q.

288

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

291 Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod57.6.1420>>. Acessado em: 05 fev.  
292 2013. DOI: 10.1095/biolreprod57.6.1420.

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

295 GASPARRINI, B. et al. Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of buffalo  
296 (*Bubalus bubalis*) oocytes: effects of cysteamine on embryo development.  
297 **Theriogenology**, v. 60, p.943-952, 2003. Disponível em:  
298 <[http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00098-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00098-0)>. Acessado em: 05 fev. 2013. DOI:  
299 10.1016/S0093-691X(03)00098-0.

300

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

305

306 HARVEY, A.J. Redox regulation of early development. **Reproduction**, v.123, p.479-  
307 486, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1530/rep.0.1230479>>. Acessado em: 05  
308 fev. 2013. DOI: 10.1530/rep.0.1230479.

309

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

314

315 HOSSEIN, M. S. et al. Effects of thiol compounds on *in vitro* maturation of canine  
316 oocytes collected from different reproductive stages. **Molecular Reproduction and**  
317 **Development**, v. 74, p.1213-1220, 2007. Disponível em:  
318 <<http://dx.doi.org/10.1002/mrd.20674>>. Acessado em: 05 fev. 2013. DOI:  
319 10.1002/mrd.20674.

320

321 HOSSEINI, S. O. et al. Effect of culture condition and cell-permeable superoxide  
322 dismutase on levels of reactive oxygen species (ROS) production in “*in vitro*” produced  
323 sheep embryos. **Small Ruminant Research**,v. 97,p.88-93, 2011. Disponível em: <  
324 <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.02.010>>. Acessado em: 05 fev. 2013. DOI:  
325 10.1016/j.smallrumres.2011.02.010.

326

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

330

331 LIVINGSTON,T. et al. Glutathione content and antioxidant enzyme expression of *in*  
332 *vivo* matured sheep oocytes. **Animal Reproduction Science**, v.116, p.265-273, 2009.  
333 Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.02.004>>. Acessado em:  
334 05 fev. 2013. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2009.02.004.

335

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

340

341 MORI, M. et al. Effects of b-mercaptoethanol and cycloheximide on survival and DNA  
342 damage of bovine embryos stored at 4°C for 72 h. **Theriogenology** v.65, p.1322-1332,  
343 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.07.018>>.  
344 Acessado em: 05 fev. 2013. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2005.07.018.

345 RODRIGUEZ-GONZALEZ, E. et al. Effects on *in vitro* embryo development and  
346 intracellular glutathione content of the presence of thiol compounds during maturation  
347 of prepubertal goat oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 65, p.446-  
348 453, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/mrd.10316>>. Acessado em: 05  
349 fev. 2013. DOI: 10.1002/mrd.10316.

350 STATISTIX®, STATISTIX 9 ANALYTICAL SOFTWARE. TALLAHASSEE, FL,  
351 USA. 2008.

352

353 TAKAHASHI, M. et al. Promoting effect of b-mercaptoethanol on *in vitro* development  
354 under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos. **Biology of Reproduction**,  
355 v.6, p.562-567, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod66.3.562>>.  
356 Acessado em: 05 fev. 2013. DOI: 10.1095/biolreprod66.3.562.

357

358 TAKAHASHI, M. et al. Effect of thiol compounds on *in vitro* development and  
359 intracellular glutathione content of bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v.49,  
360 p.228-232, 1993. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod49.2.228>>.  
361 Acessado em: 05 fev. 2013. DOI: 10.1095/biolreprod49.2.228.

362

363 THOMPSON, J.G. *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos  
364 – a decade of achievement. **Animal Reproduction Science**, v.60, p.263-275, 2000.  
365 Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00096-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00096-8)>. Acessado em: 05  
366 fev. 2013. DOI: 10.1016/S0378-4320(00)00096-8.

367

368 VAJTA, G. et al. The submarine incubation system a new tool for *in vitro* embryo  
369 culture: a technique report. **Theriogenology**, v.48, p.1379-1395, 1997. Disponível em: <  
370 [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00379-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00379-8)>. Acessado em: 05 fev. 2013. DOI:  
371 10.1016/S0093-691X(97)00379-8.

372

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

378

379 WATSON, A. J. et al. Preimplantation development of *in vitro*-matured and *in vitro*-  
380 fertilized ovine zygotes: comparison between coculture on oviduct epithelial cell  
381 monolayers and culture under low oxygen atmosphere. **Biology of Reproduction**, v.50,  
382 p.715-724, 1994. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod50.4.715>>.  
383 Acessado em: 05 fev. 2013. DOI: 10.1095/biolreprod50.4.715.

384

385 Tabela 1: Taxas de clivagem, desenvolvimento embrionário até o dia oitavo dia após a  
386 inseminação (D8) e rendimento global nos tratamentos controle e BME\*

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

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

388 \* $\beta$ -mercaptoetanol (20  $\mu$ M)

389



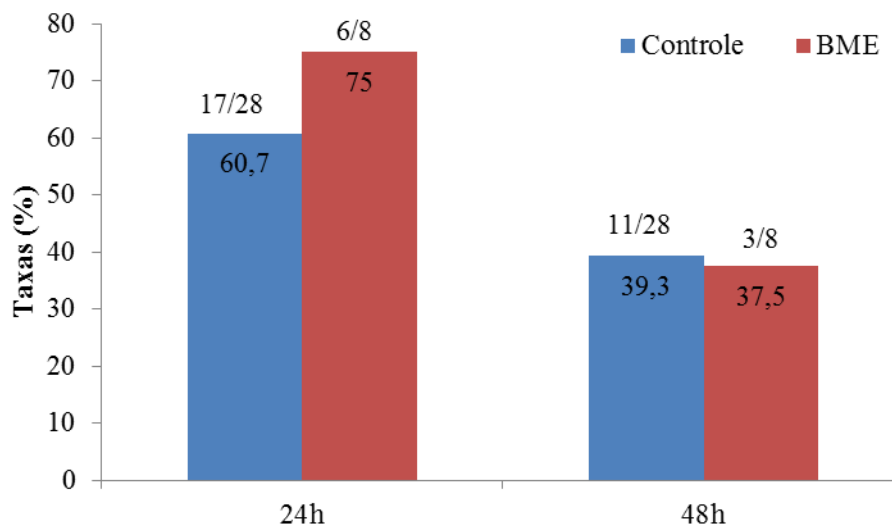
390 Tabela 2: Taxas de clivagem, desenvolvimento até o dia sétimo dia após a inseminação  
391 (D7) e rendimento global nos tratamentos controle e BME/CIS

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

392 Taxas com expoentes diferentes diferem por pelo menos  $P < 0,05$

393

394



**Tempo de cultivo suplementar *in vitro* pós-reaquecimento**

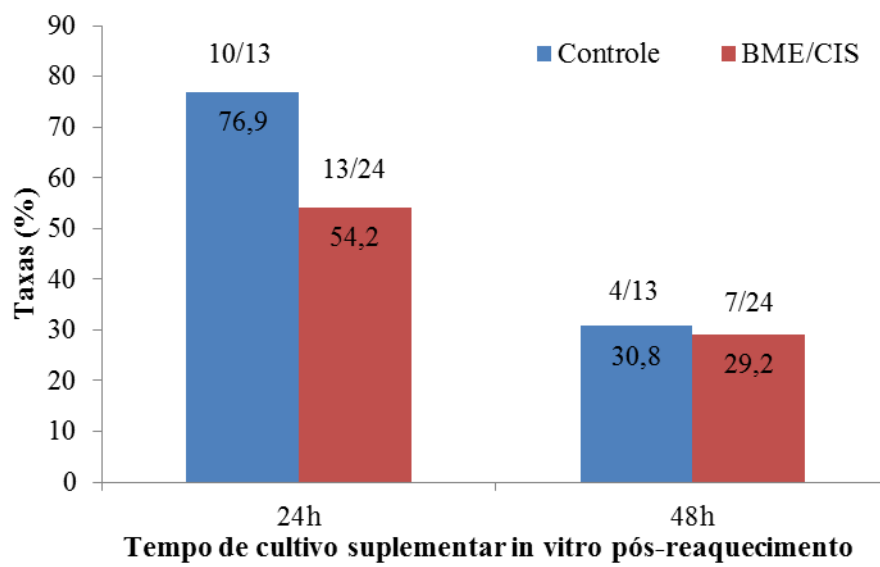
395

396 Figura 1: Taxa de re-expansão (24 h) e eclosão (48 h) por tratamento, durante cultivo

397 suplementar *in vitro* após reaquecimento de embriões vitrificados.

398

399



400

401 Figura 2: Taxa de re-expansão (24 h) e eclosão (48 h) por tratamento, durante cultivo  
402 suplementar *in vitro* após reaquecimento de embriões vitrificados.

403

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

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

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

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

Além disso, incrementando com testes moleculares e bioquímicos que demonstrem a expressão para enzimas como a glutatona, potente antioxidante intracelular, e da mensuração de tais enzimas nos meios de MIV e CIV, podendo-se assim comprovar a importância dos antioxidantes nas diferentes fases da PIV.

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

## 5 REFERÊNCIAS GERAIS

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

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

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

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

BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, L S.; GAGNON, I C.; SIRARD, M.A. Thiols prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology** v. 56, p. 275-286, 2001.

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

BYRNE, G.P.; LONERGAN, P.; WADE, M.; DUFFY, P.; DONOVAN, A.; HANRAHAN, J.P.; BOLAN, M.P. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility *in vivo* and *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v.62, p. 265–275, 2000.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DE MATOS, D.G.; HERRERA, C.; CORTVRINDT, R.; SMITZ, J.; VAN SOOM, A., NOGUEIRA, D. e PASQUALINI, R.S. Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation and embryo culture: a useful tool for increasing the efficiency of bovine *in vitro* embryo production. **Molecular reproduction and development**, v.62, p.203–209, 2002.

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

HOSSEIN, M. S.; KIM, M. K.; JANG, G.; OH, H. J.; KOO, O.; KIM, J. J.; KANG, S.K.; LEE, B. C.; HWANG, W. S. Effects of thiol compounds on *in vitro* maturation of canine oocytes collected from different reproductive stages. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, p.1213-1220, 2007.

HOSSEINI, S. O.; AGHAEI, F.; HOSSEINI, S.M.; HAJIANA, M.; FOROUZANFAR, M.; NOORBAKHSHNIA, M.; GOURABI, H.; SHAHVERDIE, A.H., DIZAJ, A. V. T.; NASR-ESFAHANI, M.H. Effect of culture condition and cell-permeable superoxide dismutase on levels of reactive oxygen species (ROS) production in "*in vitro*" produced sheep embryos. **Small Ruminant Research**, v. 97, p.88–93, 2011.

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

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

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

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

MAIA, M.S. **Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de**

**lauril sulfato de sódio (OEP), trolox-c e catalase.** Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). 2006. 165f. Faculdade de Medicina Veterinária e Ciência Animal - UNESP, Botucatu.

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

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

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

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

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

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

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

PERIS, S.I., BILODEAU, J.F., DUFOUR, M., BAILEY, J.L. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid

peroxidation, and functional parameters in ram sperm. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, p.878–892, 2007.

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

RODRIGUEZ-GONZALEZ, E.; LOPEZ-BEJAR, M.; MERTENS, M.; PARAMIO, M. Effects on *in vitro* embryo development and intracellular glutathione content of the presence of thiol compounds during maturation of prepubertal goat oocytes. **Molecular reproduction and development**, v. 65, p.446–453, 2003.

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

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

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

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

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

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

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

TAKAHASHI, M.; NAGAI, T.; HAMANO, S.; KUWAYAMA, M.; OKAMURA, N.; OKANO, A. Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v.49, p.228-232, 1993.

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

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

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

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

VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P.J.; JACOBSEN, H.; GREVE, T.; CALLESSEN, H. Open pulled straws (OPS) vitrification: a new way

to reduce cryoinjuries of bovine ova embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.51, p. 53-58, 1998.

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

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

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

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