

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**ANTIOXIDANTES ASSOCIADOS À PRESSÃO
HIDROSTÁTICA SOBRE A VIABILIDADE
EMBRIONÁRIA PÓS DESVITRIFICAÇÃO.**

Andrei Antonioni Guedes Fidelis
Médico Veterinário

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL
2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**ANTIOXIDANTES ASSOCIADOS À PRESSÃO
HIDROSTÁTICA SOBRE A VIABILIDADE
EMBRIONÁRIA PÓS DESVITRIFICAÇÃO.**

**Andrei Antonioni Guedes Fidelis
Orientador: Prof. Dr. Maurício Machaim Franco**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias (Produção Animal).

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL
Fevereiro 2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

F451a Fidelis, Andrei Antonioni Guedes, 1984-
2013 Antioxidantes associados à pressão hidrostática sobre a
 viabilida-
 de embrionária pós desvitrificação /Andrei Antonioni Guedes
 Fidelis.
 -- 2013.

51 f. : il.

Orientador: Maurício Machaim Franco.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Pro-grama de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias.
Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Bovino - Embrião - Teses. 3.
Bovino - Reprodução - Teses. I. Franco, Mauricio
Machain. II. Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
III. Título.

CDU: 619

*Serás lo que decidas ser.
Decide ser alguien en el mundo y lo serás.
Con el “no puedo” nunca se logro nada...
Pero “lo intentaré”, há hecho milagros...
(Autor desconhecido)*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Criador pelo dom da vida.

Aos meus pais Augusto e Alzira, por quem sou eternamente grato por tudo. Simplesmente não existem palavras para expor tal sentimento.

Aos meus irmãos Lula e Moraes que sempre estiveram presentes em todos os momentos e de uma maneira ou de outra me apoiaram em todas as minhas escolhas.

À GENEAL – Genética e Biotecnologia Animal, aqui representada pelo Dr. Rodolfo Rumpf, pelo suporte financeiro, delineamento e execução do projeto.

Aos amigos Chivas, Ligi, Edson Ramiro e Álvaro Leme pela colaboração substancial no projeto. Só foi possível chegarmos aqui devido ao empenho de cada um.

Ao Dr. Maurício Machaim Franco pela orientação desse trabalho.

Aos colegas Dra. Margot Dode e Prof. Dr Rafael Gianella Mondadori pela grande ajuda no desenvolvimento e discussão dos resultados.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1.INTRODUÇÃO	8
1.1 Objetivos.....	9
1.2 Hipótese.....	9
2.REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1 Pressão hidrostática.	11
2.2 Pressão hidrostática e suas correlações com sistemas biológicos e reprodução animal assistida.....	11
2.3 Espécies reativas de oxigênio (ROS).	13
2.4 Antioxidantes.....	14
2.4.1 Glutathione	14
2.4.2 β -mercaptoetanol e cisteamina	16
2.4.3 Papel dos antioxidantes na produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos.....	17
3.MATERIAL E MÉTODO	18
3.1 Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	18
3.1.1 – Recuperação dos ovócitos	18
3.1.2 – Maturação <i>in vitro</i> de ovócitos (MIV).....	19
3.1.3 – Fecundação <i>in vitro</i> (FIV)	20
3.1.4 – Cultivo <i>in vitro</i> dos embriões (CIV).....	20
3.2 - Pressão Hidrostática	21
3.3 – Vitrificação dos embriões.....	21
3.3.1 - Composição dos meios de vitrificação e aquecimento.	21
3.3.2 - Vitrificação e desvitrificação	22
3.4 - Delineamento Experimental.....	23
3.4.1 Experimento 1 – Associação da pressão hidrostática e antioxidante em blastocistos bovinos produzidos <i>in vitro</i>	23
3.4.2 – Experimento 2 – Efeito dos antioxidantes no desenvolvimento embrionário pós vitrificação.....	24
3.4.3 – Experimento 3 – Antioxidante na taxa de prenhez de embriões vitrificados.	25
3.4.4 Transferência de embriões em escala comercial	25
3.4.5 Análise estatística	26
4.RESULTADOS	26
4.1 Experimento 1	26
4.2 Experimento 2	28

4.3 Experimento 3	32
5.DISSCUSSÃO	34
6.CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS.....	40

ABREVIATURAS

ATM – Atmosfera.

BL – Blastocisto.

BME – β -mercaptoetanol.

BSA – Albumina sérica bovina.

BX – Blastocisto expandido.

CCOs – Complexo *cumulus oophorus*.

CSP – *Cold shock proteins*.

CYST – Cisteamina.

DMPBS – Solução salina em tampão fosfato.

GSH – Glutathiona.

HSP – *Heat shock proteins*.

mL – Mililitro

MPa – Mega pascal.

PH – Pressão hidrostática.

PIVE – Produção *in vitro* de embriões.

ROS – Espécie reativa de oxigênio.

SFB – Soro fetal bovino.

SOD – Superóxido dismutase.

TE – Transferência de embriões.

μ L – Microlitro

μ M – Micromolar

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Produção total de embriões nos 3 experimentos.	26
TABELA 2 – Efeito da toxicidade dos antioxidantes associado à pressão hidrostática.....	27
TABELA 3. Efeito dos antioxidantes no desenvolvimento embrionário pós desvitrificação submetidos ou não a pressão hidrostática.....	29
TABELA 4. Efeito dos antioxidantes no desenvolvimento de blastocistos (BL) pós vitrificação.	31
TABELA 5. Efeito da pressão hidrostática no desenvolvimento de blastocistos (BL) pós vitrificação.	31
TABELA 6 – Taxa de prenhez de embriões vitrificados, cultivados ou não com antioxidante.....	33
TABELA 7 – Taxa de prenhez aos 60 dias de embriões desvitrificados, cultivados ou não com betamercaptoetanol em um sistema comercial.....	33

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Mecanismo de ação do β -mercaptoetanol proposto por Ishii <i>et al.</i> 1981 e Modificado por Deleuze e Goudet, 2010. A: estrutura química do BME/CYST. B: Cistina. C: Composto BME+cisteína. D: Cisteína.	16
FIGURA 2 - Haste de vitrificação do tipo Cryotop da Ingá-med [®] (esquerda). Caixa de vitrificação de embriões (direita).	22
FIGURA 3 - Delineamento do experimento 1.....	24
FIGURA 4: Taxa de eclosão e degeneração de BX e BL em diferentes momentos de cultivo após adição de antioxidantes – experimento 1.....	27
FIGURA 5. Taxa de eclosão pós vitrificação de BL submetidos ou não à pressão hidrostática.....	30
FIGURA 6 - Efeito do fator “antioxidante na taxa de eclosão e degeneração de BL bovinos produzidos <i>in vitro</i>	32

ANTIOXIDANTES ASSOCIADOS À PRESSÃO HIDROSTÁTICA SOBRE A VIABILIDADE EMBRIONÁRIA PÓS DESVITRIFICAÇÃO.

RESUMO – Objetivou-se com o presente trabalho avaliar o efeito de dois antioxidantes no cultivo de embriões pós desvitrificação, associados ou não à pressão hidrostática (PH). Três distintos e complementares experimentos foram delineados. O primeiro consistiu em avaliar uma possível interação entre PH e antioxidante (β -mercaptoetanol - BME, cisteamina – CYST e BME + CYST). O segundo foi similar ao primeiro, entretanto, os embriões foram vitrificados uma hora após passarem ou não pela PH. Os parâmetros avaliados foram taxas de eclosão e degeneração com 24 e 48 horas após passar pela PH (exp. 1) e 12, 24, 48 e 72 horas pós desvitrificação (exp.2) A última etapa do trabalho avaliou a taxa de prenhez de embriões cultivados por 12 horas com/sem antioxidante (exp.3). O primeiro experimento não demonstrou qualquer tipo de interação entre os tratamentos quando o estágio embrionário foi desconsiderado. Houve significância para todos os parâmetros ao confrontar blastocisto expandido (BX) e blastocisto (BL). No segundo experimento os resultados foram similares para todos os parâmetros avaliados em embriões BX. O tratamento BME + CYST obteve melhor taxa de eclosão dos BL com 48 e 72 horas (76,04%) do que o grupo controle (45,83%). O mesmo comportamento ocorreu para a taxa de degeneração às 24 horas (grupo BME + CYST = 7,29% contra 32,29% do grupo controle). Entretanto, ao transferir os embriões (n= 55), percebeu-se uma similaridade nas taxas de prenhez do grupo controle fresco, controle vitrificado e BME (38,9%; 16,7% e 31,6%, respectivamente). O presente trabalho mostrou que o uso da pressão hidrostática e de BME e CYST não influencia, a partir dos parâmetros avaliados, as taxas de eclosão e degeneração de embriões vitrificados. Contudo, há uma melhoria significativa para embriões BL quando se associa BME + CYST no meio de cultivo pós desvitrificação.

Palavras-chave: embrião, bovino, β -mercaptoetanol, cisteamina, criopreservação

ASSOCIATION BETWEEN ANTIOXIDANT AND HIDROSTATIC PRESSURE ON THE EMBRYONIC VIABILITY AFTER WARMING.

ABSTRACT –This study aimed to evaluate different antioxidants in embryo culture after vitrification, with or without the previous use of hydrostatic pressure (PH). Considering this, three experiments were designed to evaluate the interaction between PH and antioxidants (β -mercaptoethanol - BME, cysteamine - CYST and BME + CYST) in fresh and vitrified in vitro produced embryos. In experiment 1 hatching and degeneration rates were evaluated with 24 and 48 hours after passing through the PH and in experiment 2, the same parameters were evaluates at 12, 24, 48 and 72 hours after heating. The last step of the study evaluated the pregnancy rate of vitrified embryos, cultured for 12 hours with / without antioxidant. The first experiment showed no difference between treatments the differences, independent of the treatment, were obtained between expanded blastocyst (BX) and blastocyst (BL). The second experiment found similar results for all parameters evaluated in embryos BX. Note that the BME + cyst treatment got better hatching rate in the BL with 48 and 72 hours (76.04%) than the control group (45.83%). The same behavior was observed in degeneration 24 hours, where the BME + CYST group was 7.29 % against 32.29% in the control group. However, the pregnancy rates (55 embryo transfers) were not different between groups control fresh, control vitrified and BME (38.9%, 16.7% and 31.6%, respectively). This study showed that the use of hydrostatic pressure and antioxidant had no effect in the evaluated parameters. However. there is a significant improvement to BL embryos when combining BME + CYST in the culture medium after vitrification.

Keywords: embryo, bovine, β -mercaptoethanol, cysteamine, cryopreservation.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil tornou-se referência mundial em produção *in vitro* de embriões (PIVE), onde lidera o “ranking” há alguns anos. O país detém aproximadamente 58% da produção mundial desses embriões. Isso demonstra um foco em aumentar a produtividade da pecuária, tendo em vista uma crescente substituição de áreas destinadas à criação bovina para agricultura. Esse fato revela o compromisso do país com a qualidade de seu rebanho e a incessante busca de melhoramento genético e eficiência de produção.

A utilização de biotecnologias na reprodução animal possui um papel chave para a multiplicação de animais geneticamente superiores. A quantidade de embrião bovino produzido *in vitro* é maior a cada ano no Brasil. Em contrapartida, o número de receptoras aptas a ingressarem nos programas comerciais não abastece o cenário nacional de maneira adequada. Isso acarreta num desequilíbrio entre número de embriões produzidos e quantidade de receptoras disponíveis. Diante desse entrave, a necessidade de criopreservar os embriões excedentes é uma alternativa bastante interessante, pois o processo de criopreservação permite armazenar material biológico por período indeterminado com pouca perda de viabilidade. Isso torna possível uma logística economicamente interessante para o sistema agropecuário, onde o investimento com protocolos de sincronização de estro seria mais eficiente. Além do impacto no setor produtivo, a criopreservação é indispensável para a conservação de raças e espécies ameaçadas de extinção.

Porém, sabe-se que o embrião oriundo de lavado uterino (*in vivo*) detém características distintas quando comparado ao PIVE, como uma menor quantidade de lipídeos, maior grau de compactação, melhor qualidade das junções entre botão embrionário e trofoblasto (VAN SOOM *et al.*, 1992). Isso explicaria, em parte, uma maior sensibilidade ao processo de criopreservação dos embriões PIVE.

Nesse contexto, a vitrificação pode ser considerada como alternativa de criopreservação mais adequada para os respectivos embriões. Diversos protocolos de vitrificação já foram desenvolvidos desde o primeiro relato da técnica (RALL e FAHY, 1985), onde as principais alterações desde então consistiram em aumentar consideravelmente a taxa de resfriamento/aquecimento pela redução no volume da

solução de vitrificação (MORATO *et al.*, 2008; RIOS *et al.*, 2010; VAJTA, 2000; VAJTA e KUWAYAMA, 2006).

O uso da pressão hidrostática anterior a vitrificação (BOCK *et al.*, 2008; PRIBENSZKY *et al.*, 2004; SIQUEIRA FILHO *et al.*, 2011) vem sendo utilizada como forma de preparar o embrião para o estresse da criopreservação a partir de um estresse prévio.

Além dessa alternativa, a utilização de compostos antioxidantes (β -mercaptoetanol e cisteamina) no meio de maturação, durante o cultivo e/ou no cultivo pós desvitrificação têm demonstrado efeitos positivos no embrião PIVE (BAGIS *et al.*, 2010; DE MATOS e FURNUS, 2000; FURNUS *et al.*, 2008; HOSSEINI *et al.*, 2009). Contudo, ainda não há relatos sobre a associação dessas novas metodologias e um possível sinergismo benéfico para o incremento nas taxas de prenhez de embriões bovinos vitrificados.

1.1 Objetivos

Esse trabalho tem por objetivo avaliar a influência dos antioxidantes BME, CYST e ambos no cultivo embrionário pós desvitrificação de embriões bovinos submetidos ou não à pressão hidrostática e na taxa de prenhez.

1.2 Hipótese

A adição de antioxidantes no cultivo pós desvitrificação de embriões bovinos PIVE submetidos à pressão hidrostática proporciona melhor qualidade embrionária e maiores taxas de prenhez.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Quando Polge *et al.* (1949) postularam um efeito crioprotetor do glicerol em células espermáticas durante o congelamento, um vasto campo de pesquisa começou a existir; a criopreservação de gametas e embriões. Iniciou-se, portanto, a possibilidade de armazenar e conservar o material genético por tempo indeterminado.

Entretanto, trabalhos com congelamento de embriões só vieram à luz a partir da década de 60. Wilmut e Rowson (1973) relataram o nascimento do primeiro bovino oriundo de um embrião congelado. Diversos grupos de pesquisadores focaram seus esforços para incrementar a técnica de criopreservação de embriões provenientes de lavado uterino (*in vivo*), enquanto outros destinaram suas pesquisas para a produção *in vitro* desses embriões.

Após três décadas de avanços na reprodução assistida, hoje é possível congelar e transferir embriões bovinos oriundos de lavado uterino com taxas de gestação próximas as obtidas com embriões frescos (HASLER, 2003). Contudo, a criopreservação de embriões PIVE ainda apresenta baixos índices de gestação (AGCA *et al.*, 1998; AKIYAMA *et al.*, 2010; BLOCK *et al.*, 2010; STEWART *et al.*, 2011; TOMINAGA, 2004). Vários fatores já foram associados à baixa criotolerância desses embriões, dentre eles: alta quantidade de lipídeos, menor grau de compactação das células embrionárias (VAN SOOM *et al.*, 1992), botão embrionário menor e com junções incompletas com as células do trofoblasto (IWASAKI *et al.*, 1990).

Algumas estratégias para minimizar esses aspectos negativos são utilizadas em distintas partes do processo. Uma visa melhorar a qualidade do embrião cultivado *in vitro*, como utilização de baixa tensão de oxigênio, substituição de soro fetal bovino (SFB) por albumina sérica bovina (BSA) (CORREA *et al.*, 2008; RIZOS *et al.*, 2003), utilização de antioxidantes durante o cultivo embrionário ou após a desvitrificação (BAGIS *et al.*, 2010; HOSSEINI *et al.*, 2009; NEDAMBALE *et al.*, 2006). Outro ponto prima por modificar o sistema de criopreservação propriamente dito, como por exemplo, a vitrificação. Esse método consiste em submeter os embriões a altas concentrações de crioprotetores com uma alta velocidade de

resfriamento, onde o estado vítreo é alcançado sem a formação de cristais de gelo (RALL e FAHY, 1985). Uma recente linha de pesquisa tem estudado maneiras inovadoras de preparar o embrião para o estresse da criopreservação a partir de um estresse prévio; o uso da pressão hidrostática anterior ao processo de vitrificação (PRIBENSZKY e VAJTA, 2011; PRIBENSZKY *et al.*, 2010; SIQUEIRA FILHO *et al.*, 2011).

2.1 Pressão hidrostática.

A pressão hidrostática (PH) é uma variável termodinâmica existente na biosfera terrestre. Varia de 1 atmosfera (atm) ao nível do mar e pode chegar a 1100 atm nas regiões mais profundas do oceano. Existem variações de medida, onde 1 atm corresponde a 0,1 megapascal (MPa) e 1,01 bar.

O princípio de Le Chatelier define que quando uma reação é acompanhada por um aumento de volume, a mesma é inibida pelo aumento da pressão. Porém, quando a reação segue com uma diminuição do volume, ela é acelerada pelo aumento da pressão (PALOU *et. al.*, 1997). Mesmo com esses conceitos bem definidos, os efeitos da pressão hidrostática em sistemas biológicos são bastante complexos.

2.2 Pressão hidrostática e suas correlações com sistemas biológicos e reprodução animal assistida.

O uso da pressão hidrostática em sistemas biológicos teve início no começo do século XX. O seu principal foco era conservar frutas e leite através da redução da microbiota existente. Entretanto, Wemekamp-Kamphuis *et al.* (2002) observaram um comportamento contrário ao esperado. Colônias de *Listeria monocytogenes* foram rapidamente multiplicadas após passar pela pressão hidrostática de 400 a 650 MPa (considerada letal até então). Esse primeiro tratamento bórico foi de caráter subletal e protegeu as colônias para um segundo tratamento. Com isso, ao invés de reduzir, as bactérias se desenvolveram exponencialmente.

A partir de então, diversas linhas de pesquisas foram motivadas a extrapolar o princípio memorável do pensador Friedrich Nietzsche - “*O que não provoca minha morte faz com que eu fique mais forte.*” - para a área da reprodução assistida. Diferentes tipos de estresse foram estudados, como o osmótico, o oxidativo e o térmico.

Vandaele *et al.* (2010) induziram estresse oxidativo em ovócitos maturados com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por uma hora, antes da fecundação *in vitro*. As taxas de blastocisto e o número de células apoptóticas foram melhores no grupo submetido ao radical livre. Lin *et al.* (2009) também relataram um incremento nas taxas de eclosão dos embriões submetidos a um estresse hiperosmótico com cloreto de sódio pelo mesmo intervalo de tempo. Contrariamente ao princípio supracitado, o estresse térmico não foi eficaz em preparar o embrião para uma etapa subsequente mais grave, mesmo com diferentes tempos de exposição ao agente (JU *et al.*, 1999; TSENG *et al.*, 2006).

A maioria das proteínas que estão envolvidas na resposta ao estresse pertence à família das chaperonas. Elas detêm papel fundamental durante o processo de criopreservação, pois evitam a agregação de proteínas desnaturadas e auxilia no retorno da sua forma ativa (ELLIS, 1987). Esse grupo se destaca dos demais por conservar e participar de diversas funções celulares, como reparo e estabilização protéica de cromatina e do DNA; regulação do estado redox e controle do ciclo celular (CSERMELY *et al.*, 1998; KULTZ, 2003). Heat Shock Proteins (HSP) e Cold Shock Proteins (CSP) pertencem a essa família e o seu padrão de expressão gênica é bastante controverso. Quando submetido à pressão hidrostática, a maior parte dos genes possui uma expressão inibida, enquanto que a síntese de HSP e CSP é aumentada (MENTRE e HUI BON HOA, 2001).

A pressão hidrostática atua imediatamente e uniformemente em cada ponto da amostra, ao contrário do que ocorre com outros agentes causadores de estresse. Além de ser uma tecnologia não invasiva, ela possui uma alta precisão e consistência. As mudanças nos parâmetros de pressão durante o tratamento também são imediatas. A margem de segurança é muito alta - variações de 40 a 80 MPa em embriões bovinos não afetam a viabilidade embrionária, diferentemente do que ocorre com agentes térmicos, onde uma pequena mudança de 2-3 C° é suficiente para o incremento ou a morte celular (PRIBENSZKY e VAJTA, 2011). A

pressão de 80 MPa exercida em embriões é a mesma encontrada no ponto mais profundo do oceano Atlântico; um valor muito maior do que é encontrado em um ambiente fisiológico celular (0,2MPa).

Siqueira-Filho (2009) ao testar diferentes tempos de pressão, temperatura e intervalo pressão/vitrificação em embriões bovinos, obteve melhores taxas de re-expansão e eclosão a 32 C°, submetidos por uma hora em uma pressão de 60 MPa. Concluiu também que o melhor intervalo entre a retirada da pressão e a vitrificação foi de 1 hora. A abundância relativa de mRNA de genes relacionados ao estresse térmico, oxidativo e osmótico foi maior em embriões vitrificados com 1 hora após a PH (SIQUEIRA FILHO *et al.*, 2011).

2.3 Espécies reativas de oxigênio (ROS).

Qualquer tipo de átomo, molécula ou fragmento de molécula que possui pelo menos um elétron não compartilhado na camada de valência é considerado radical livre. Enxofre, carbono, nitrogênio e oxigênio são os mais comuns e são conhecidos como espécie reativa de oxigênio, nitrogênio, etc. Dentre eles, o ROS é mais relevante que os demais, uma vez que é produzido durante o processo de redução do oxigênio na etapa final da cadeia transportadora de elétrons (DORMANDY, 1980). O oxigênio tem uma alta reatividade por possuir dois elétrons desemparelhados, cada um localizado em um orbital. Portanto, pode ser considerado um radical livre por definição (EVANS e HALLIWELL, 1999).

O excesso de produção de ROS e/ou uma falha do mecanismo antioxidante intracelular causa um desequilíbrio conhecido por estresse oxidativo. Tal estresse pode ocasionar danos às biomoléculas (proteínas, DNA e lipídeos), apoptose em diversos tipos celulares (LIU *et al.*, 2003) e alterações no desenvolvimento embrionário (NAVARRO *et al.*, 2006). Porém, diversas funções fisiológicas reprodutivas como a maturação ovocitária, ovulação, formação de blastocisto, esteroidogênese ovariana, manutenção do corpo lúteo e luteólise requerem o envolvimento dessas espécies reativas de oxigênio para manutenção da homeostasia (ISHIKAWA, 1993; SABATINI *et al.*, 1999). Há relatos de que a retomada da meiose é induzida por um aumento de ROS e inibida por agentes

antioxidantes (KODAMAN e BEHRMAN, 2001; TAKAMI *et al.*, 2000). Isso indica que a geração desses radicais livres pelo folículo é fundamental para o decorrer da fisiologia ovulatória.

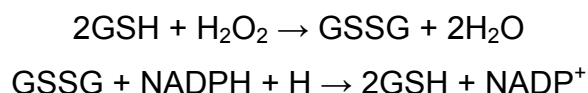
Um equilíbrio entre a produção dos radicais livres e a neutralização dos mesmos com antioxidantes é necessário. Por esse motivo é que a célula possui eficientes sistemas de defesa antioxidante: enzimático e não enzimático (SIES, 1993). Dentro do sistema enzimático destacam-se a superóxido dismutase (SOD), catalase. A glutathione (GSH) é o principal composto antioxidante não enzimático.

2.4 Antioxidantes

2.4.1 Glutathione

A glutathione, um tripeptídeo tiol (γ -glutamylcysteinylglycine), é o maior composto sulfídrico não protéico presente nas células de mamíferos. Possui um papel chave na detoxificação e antioxição de compostos exógenos e endógenos, mantendo o estado redox intracelular (LUBERDA, 2005). Participa no transporte de aminoácidos, síntese protéica (LAFLEUR *et al.*, 1994) além de servir como um reservatório de cisteína (MEISTER e TATE, 1976).

O grupo sulfidril (SH) da glutathione confere uma ação protetora contra danos oriundos do estresse oxidativo. A GSH existe de duas formas: a forma reduzida (GSH) e a forma oxidada (GSSG). A seguinte equação resume o mecanismo de oxirredução da glutathione na presença das enzimas glutathione reductase e/ou glutathione peroxidase.



A concentração de GSH intraocitária aumenta durante a maturação e atinge o platô próximo a ovulação (PERREAULT *et al.*, 1984). Ovócitos maturados *in vitro* possuem concentrações de glutathione similares em diferentes espécies. Entretanto, ao verificá-los *in vivo*, Brad *et al.* (2003) observaram uma concentração muito superior. Uma possível explicação para tamanha discrepância de concentração de

GSH deve-se uma exacerbada exposição dos ovócitos maturados *in vitro* ao O₂ atmosférico e, conseqüentemente ao ROS. A mobilização de glutatona intracelular para proteger o ovócito do estresse oxidativo resulta em um drástico declínio desse composto. Ao avaliar o comportamento do referido tripeptídeo em ovócitos submetidos à baixa tensão de O₂, Hashimoto *et al.* (2000) observaram uma diminuição de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) nos mesmos, seguidos de uma maior competência ovocitária.

Diversos trabalhos sugerem que a síntese de GSH durante a maturação ovocitária e o cultivo embrionário *in vitro* são cruciais para o incremento nas taxas de blastocisto (DE MATOS e FURNUS, 2000; FURNUS *et al.*, 2008; TAKAHASHI *et al.*, 1993). Alguns compostos derivados do tiol, tais como o β-mercaptoetanol e a cisteamina, aumentam a síntese de glutatona. Esse fenômeno deve-se ao fato de que a síntese de GSH é altamente dependente de cisteína no meio de cultivo e tanto o BME como a cisteamina aumentam a concentração de cisteína intracelular ao utilizar a cistina do meio de cultivo (ISHII, BANNAL, *et al.*, 1981; RATHBUN e MURRAY, 1991).

A cistina é um aminoácido natural, formado pela dimerização da cisteína em condições oxidantes, que contém uma ligação entre dois átomos de enxofre. Ao adicionar cisteína ao meio de cultivo celular, ela é rapidamente oxidada em cistina, tornando-se pouco aproveitada por alguns tipos celulares (TAKAHASHI *et al.*, 2002). A cisteína, um componente do tiol (possui um grupo funcional composto de enxofre e hidrogênio – grupo sulfidril SH), é transportada para dentro das células pelo sistema de transporte ASC (*alanine-serine-cysteine transport system*), ao passo que a cistina utiliza outro sistema transportador, o Xc (*cystine-glutamate exchange system*). O tipo de transportador depende do tipo celular. Os ovócitos possuem apenas o ASC, o que os torna incapazes de utilizar a cistina do meio. Já as células do *cumulus* possuem os dois sistemas transportadores; portanto, a cistina absorvida por elas é reduzida em cisteína e prontamente utilizada para síntese de GSH, que por sua vez é transportada ao ovócito pelas junções do tipo GAP (SUTTON *et al.*, 2003). A eficiência de síntese de GSH é maior quando há presença de cisteína no meio, pois tanto o ovócito quanto as células do *cumulus* podem aproveitar essa fonte (DE MATOS *et al.*, 1997).

Um dos meios utilizado para produção de embriões (TCM 199) possui uma concentração de cisteína muito baixa, enquanto a de cistina é mais alta. Essa cisteína do meio tende a ser oxidada a cistina em aproximadamente 1 hora. O mesmo ocorre com a cisteína presente no soro fetal bovino (BALASUBRAMANIAN e RHO, 2007; CAAMANO *et al.*, 1996). Nesse contexto, a utilização de compostos que aumentam a disponibilidade de cisteína na forma reduzida torna-se bastante interessante, como o β -mercaptoetanol e a cisteamina.

2.4.2 β -mercaptoetanol e cisteamina

A linhagem de linfócitos L1210 (células de linfoma de camundongo) é deficiente em aproveitar a cistina. Entretanto, ao adicionar BME ao meio, Ishii *et al.* (1981) relataram um aumento nas concentrações de cisteína e GSH intracelular. A partir desse estudo, o mesmo grupo postulou o mecanismo de funcionamento do BME (Figura 1).

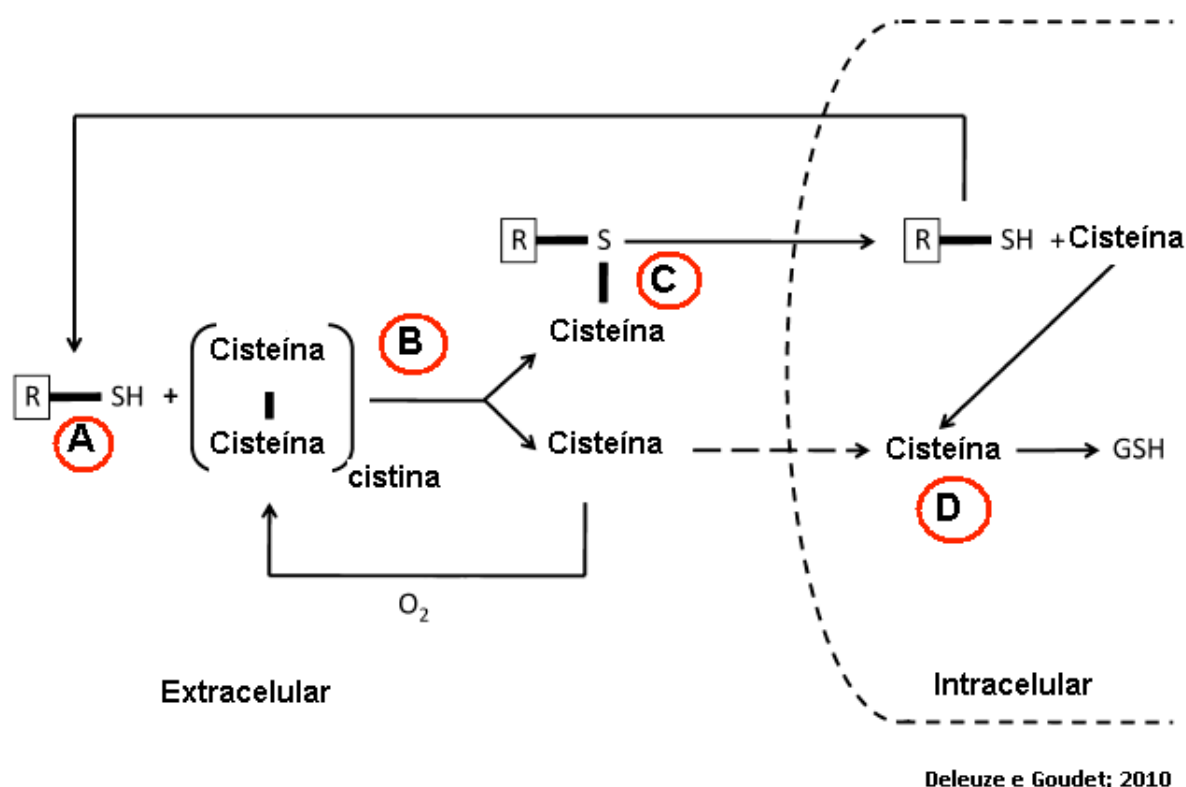


FIGURA 1: Mecanismo de ação do β -mercaptoetanol proposto por Ishii *et al.* 1981 e Modificado por Deleuze e Goudet, 2010. A: estrutura química do BME/CYST. B: Cistina. C: Composto BME+cisteína. D: Cisteína.

O mecanismo de ação do BME (A) é similar ao da cisteamina e resume-se basicamente em uma dissociação da cistina (B) com consequente formação de um composto BME + cisteína (C). Ao entrar na célula, o composto se desfaz. O BME volta para o meio extracelular e a cisteína (D) é utilizada para formação de GSH ou de proteína. A cisteína pode sair para o meio extracelular através do sistema ASC e associar-se com o BME ou ser oxidada e formar cistina, o que é mais freqüente.

2.4.3 Papel dos antioxidantes na produção *in vitro* de embriões bovinos

A equipe liderada por Pabon *et al.* (1989) foi uma das primeiras a relatar efeitos adversos da concentração de O₂ atmosférico (aproximadamente 20%) em embriões murinos quando comparados a uma tensão de 5% - concentração fisiológica segundo Fisher *et al.* (1993). Desde então, outros grupos confirmaram os danos no desenvolvimento embrionário devido à alta tensão de O₂, seja avaliando o funcionamento de enzimas antioxidantes como a SOD (ORSI e LEESE, 2001; UMAOKA *et al.*, 1992), por danos no DNA (HALLIWELL e ARUOMA, 1991) ou por taxas de produção embrionária propriamente dita (ALI *et al.*, 2003; JOHNSON e NASR-ESFAHANI, 1994; KITAGAWA *et al.*, 2004). Algumas alternativas foram propostas para contornar os problemas relacionados à alta tensão de oxigênio e, consequentemente, a alta concentração de radicais livres. Dentre elas, a utilização de um sistema de baixa tensão de O₂ durante o cultivo (UMAOKA *et al.*, 1992), ou ainda, a adição de antioxidantes aos meios de cultivo, tais como a glutathione, cisteamina ou β-mercaptoetanol (DE MATOS e FURNUS, 2000; DE MATOS *et al.*, 1997; DE MATOS *et al.*, 2002; FURNUS *et al.*, 2008).

Os derivados do tiol (BME e cisteamina) têm sido amplamente utilizados nos meios de produção *in vitro* de embriões durante a maturação (CAAMANO *et al.*, 1996; DE MATOS e FURNUS, 2000; TAKAHASHI *et al.*, 1993) e o cultivo (DE MATOS *et al.*, 2002; HOSSEINI *et al.*, 2009; TAKAHASHI *et al.*, 2002) e, recentemente, durante o cultivo pós vitrificação (BAGIS *et al.*, 2010). Nedambale *et al.* (2006) demonstraram que a adição de BME durante o cultivo embrionário aumentou a taxa de sobrevivência embrionária, eclosão e número de células após a vitrificação. Hosseini *et al.* (2009) também obtiveram resultados similares na

produção de embriões, porém, relataram que a fragmentação de DNA não foi minimizada pelo acréscimo de um antioxidante no cultivo.

Sabe-se que embriões produzidos *in vitro* são extremamente vulneráveis às injúrias da criopreservação e os danos causados por mudanças de água/crioprotetor entre embrião e meio extracelular (DINNYES *et al.*, 1999; PUGH *et al.*, 2000) podem ser, muitas vezes, irreversíveis. Após o processo de vitrificação, o embrião adquire um aspecto estrutural muito mais frágil (HALLIWELL *et al.*, 1992), deixando-o mais susceptível ao estresse oxidativo. Nesse aspecto, o BME possui uma função mais direta, neutralizando os radicais livres ao invés de aumentar a síntese de glutatona, o que em tese levaria mais tempo.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Produção *in vitro* de embriões

3.1.1 – Recuperação dos ovócitos

Os ovários foram coletados em abatedouro local, de vacas sem raça definida, distante a 80 km do laboratório, transportados em solução salina 0,9% com temperatura entre 32 a 35 °C. O tempo de recuperação dos ovócitos variou entre 4 a 6 horas após o início do abate dos animais.

No laboratório, folículos de 2 a 8 mm foram puncionados com auxílio de uma seringa de 10ml e uma agulha de calibre 16G. O líquido resultante era transferido para tubos de centrifuga de 15 ml e mantido em banho-maria (36 °C) até a sedimentação das células e formação de um *pellet*. O sobrenadante era retirado e o *pellet* ressuspensionado com DMPBS (Nutricell®) e espalhado em placas de Petri 100 x 20 mm (TPP®) suplementado com 1% de SFB para rastreamento dos CCOs. Os CCOs eram transferidos para uma placa de Petri com menor diâmetro (35x10 mm) contendo meio denominado “LAV” (TCM 199 com sais de Hank’s -Gibco BRL®, suplementado com 10% de SFB e antibiótico), onde permaneciam sobre uma placa

aquecedora até a seleção das estruturas. Os CCOs foram rastreados e selecionados sob estereomicroscópio (SMZ 645 – NIKON®).

Apenas os ovócitos de qualidade I e II foram selecionados para o experimento, segundo a classificação utilizada pela IETS – *International Embryo Technology Society*. Foram considerados ovócitos de qualidade I os que apresentaram células do *cumulus* compactas e mais de três camadas envolvendo o ovócito, o citoplasma homogêneo com granulações finas, preenchendo o interior da zona pelúcida e coloração amarronzada. Os ovócitos de qualidade II apresentavam células do *cumulus* compactas em volta do ovócito com pelo menos três camadas, citoplasma preenchendo todo o espaço do interior da zona pelúcida e granulações distribuídas heterogeneamente.

Entre o início da aspiração e o início do rastreamento, estabeleceu-se um tempo máximo de 30 minutos e do rastreamento para seleção/maturação, um período de 1 hora.

Exceto quando indicado, todos os reagentes foram obtidos da Sigma Aldrich do Brasil®. Os meios utilizados em todas as etapas da PIV dos embriões foram produzidos pelo próprio laboratório GENEAL e testados previamente.

3.1.2 – Maturação *in vitro* de ovócitos (MIV)

A composição do meio de maturação (MIV) consistiu de TCM 199 com sais de Earl's (Gibco - BRL®) suplementado com 12 UI/ml Hormônio Luteinizante, 0,01 UI/ml de Hormônio Folículo Estimulante, 0,1 mg/ml de L-glutamina, 0,075 mg/ml de Amicacina, 10% de Soro Fetal Bovino (SFB – Gibco BRL®), 100µM de Cisteamina e 1mg/ml de Estradiol.

Os ovócitos selecionados foram lavados e transferidos em grupos de 40 por tubo de poliestireno de 5 ml (Falcon®) com 400 µl de meio de maturação (MIV) e 250 µl de óleo mineral. Foram maturados por 22 a 24 horas.

3.1.3 – Fecundação *in vitro* (FIV)

Após o período de maturação os ovócitos foram lavados e transferidos para gotas de 150 µl de meio de fecundação (FEC), suplementado com 10 µg/ml de Heparina e PHE – 2 mM de penicilamina, 1 mM de hipotaurina, 250 mM de epinefrina (Sigma®).

O sêmen utilizado em todos os experimentos foi de um mesmo touro e mesma partida, previamente testados para PIVE. Após descongelamento por 30 segundos em banho-maria a 36 °C, os parâmetros de motilidade e vigor foram analisados antes e após a seleção espermática, realizada através do gradiente de Percoll®, conforme proposto por Machado *et al.* (2009). O cálculo da dose inseminante/gota foi ajustado para uma concentração final equivalente a 1×10^6 espermatozóides/ml.

Ovócitos e espermatozóides foram co-incubados por 18 horas em estufa a 39 °C, com 5% de CO₂. Considerou-se o dia da fecundação como D0.

3.1.4 – Cultivo *in vitro* dos embriões (CIV)

Ao término do período de FIV, os possíveis zigotos foram pipetados para leve desnudamento e transferidos para gotas de 150 µl do meio de cultivo Fluido Sintético de Oviduto suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais (SOFaa) e 0,34mM de sodium tri citrato; 2,77mM de myo-inositol e 5% de SFB.

Os embriões foram mantidos na mesma condição de temperatura, umidade e atmosfera gasosa por todo o período de cultivo, avaliados em D3 (72h *pi*) quanto à clivagem e em D6 (144h *pi*) e D7 (168h *pi*) para taxa de desenvolvimento de blastocisto.

Todos os embriões D7 foram classificados segundo o manual da sociedade Internacional de Transferência de Embriões - IETS e apenas blastocistos de qualidade 1 foram utilizados.

3.2 - Pressão Hidrostática

Blastocistos (BL) e blastocistos expandidos (BX) foram aleatoriamente divididos em dois grupos. Um grupo de cada estágio permaneceu na estufa (grupo sem pressão – SEM) e o outro foi retirado do cultivo e lavado em meio H-SOF (SOF + hepes) a 37°C. Após a lavagem, os embriões foram envasados em grupos de no máximo dez e inseridos na câmara de pressão hidrostática (Cryoinnovation Ltda, Budapeste, Hungria), onde permaneciam por uma hora a 32 °C, submetidos a uma pressão hidrostática de 60 MPa, segundo metodologia descrita por Siqueira Filho (2009) - grupo com pressão hidrostática (COM). Após esse procedimento, os embriões foram desenvasados, cultivados por uma hora e vitrificados.

O grupo SEM foi vitrificado durante esse intervalo “cultivo – vitrificação” do grupo COM. Dessa maneira, o processo de vitrificação dos dois grupos foi seqüencial, onde o término do grupo SEM coincidia com o início da criopreservação do grupo COM.

3.3 – Vitrificação dos embriões.

3.3.1 - Composição dos meios de vitrificação e aquecimento.

SM - Solução de Manutenção: TCM-199 Hank's (Gibco BRL, Burlington, ON, Canadá) acrescido com 20% de SFB.

SV1 – Solução de Vitrificação 1: SM acrescido de 7,5% etileno glicol e 7,5% de DMSO

SV2 – Solução de Vitrificação 2: SM suplementado com 15% etileno glicol, 15% DMSO e 0,5 M de sacarose.

DV1 – Solução de Desvitrificação 1: SM acrescido de 1 M de sacarose.

DV2 – Solução de Desvitrificação 2: SM acrescido de 0,5M de sacarose.

3.3.2 - Vitrificação e desvitrificação

Para a vitrificação foram utilizadas as soluções e o protocolo de acordo com a metodologia desenvolvida por Kuwayama *et al.* (2005). Entretanto, as hastes e o equipamento utilizado (Figura 2) foram adquiridos da Ingá-med[®] (Maringá-PR, Brasil). A solução de manutenção (SM) foi usada para manutenção dos embriões durante a vitrificação e aquecimento. Todas as manipulações foram realizadas em temperatura ambiente (25 a 27°C). Todos os meios utilizados estavam em temperatura ambiente, com exceção da solução de desvitrificação 1 (DV1), aquecida a 37°C.

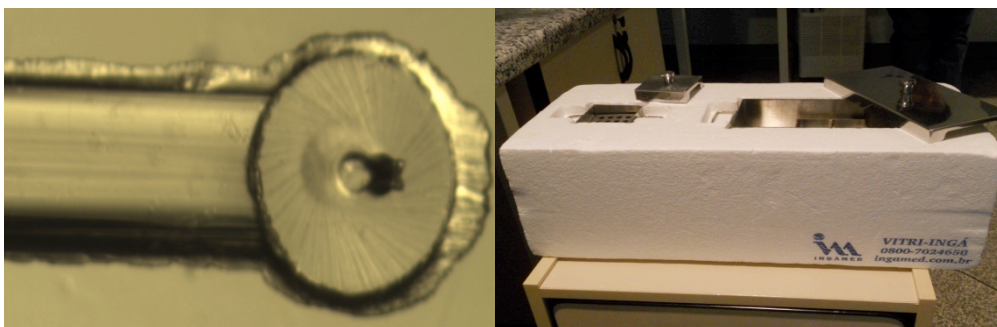


FIGURA 2 - Haste de vitrificação do tipo Cryotop da Ingá-med[®] (esquerda). Caixa de vitrificação de embriões (direita).

Os embriões eram retirados do cultivo em um máximo de 24 estruturas e submetidos a 2 banhos seqüenciais em gotas de 150 µl de SV1, com tempo de permanência de 9 a 15 minutos. Transcorrido esse tempo de equilíbrio, 6 a 7 embriões eram transferidos para SV2, onde passavam por 3 banhos de 20µl cada, perfazendo um tempo de 45 a 60 segundos.

Os blastocistos eram então colocados nas hastes de vitrificação com auxílio de micro pipeta de vidro com diâmetro aproximado de 150 µm. Imediatamente após a deposição dos embriões nas hastes, o excesso de solução era retirado deixando somente uma fina camada sobre os embriões. A haste era submergida verticalmente no nitrogênio líquido, onde permanecia por 30 minutos.

A desvitrificação consistia em retirar a haste do nitrogênio líquido com auxílio de uma pinça e mergulhar a extremidade contendo os embriões na DV1. Todas as gotas tinham um volume de 150µl. Com movimentos rápidos, os embriões se soltavam da haste e permaneciam na solução por 1 minuto. Posteriormente eram transferidos para uma solução menos concentrada (DV 2) durante 3 minutos. Finalmente eram submetidos a duas lavagens em gotas de SM, permanecendo 5 minutos em cada gota.

3.4 - Delineamento Experimental.

3.4.1 Experimento 1 – Associação da pressão hidrostática e antioxidante em blastocistos bovinos produzidos *in vitro*.

Nesse experimento foi avaliado o efeito da pressão hidrostática associada ao posterior cultivo com agentes antioxidantes na sobrevivência de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* (Figura 3). Para tal, BX e BL foram aleatoriamente divididos em dois grupos e submetidos ou não à pressão de 60 MPa, a 32°C, por uma hora, segundo Siqueira Filho (2009). Após esse período foram novamente divididos em grupos, conforme descrito abaixo, e a taxa de eclosão e degeneração foi avaliada em 24 e 48 horas.

Após uma hora em cultivo ou na câmara de pressão, os BX foram novamente divididos ao acaso e separados em 4 grupos: (1) CONT (Controle) cultivo em meio SOF; (2) BME – cultivo em SOF acrescido com 100µM de betamercaptoetanol; (3) CYST – cultivo em SOF acrescido de 100µM de cisteamina e (4) BME + CYST – cultivo em SOF acrescido de 100µM de BME e 100µM de CYST. O mesmo procedimento foi realizado com os BL.

Nota-se, a partir de então, a formação de oito grupos por estágio embrionário (BX e BL), onde se tem 2 grupos (SP - SEM e PH - COM) com 4 tratamentos cada um.

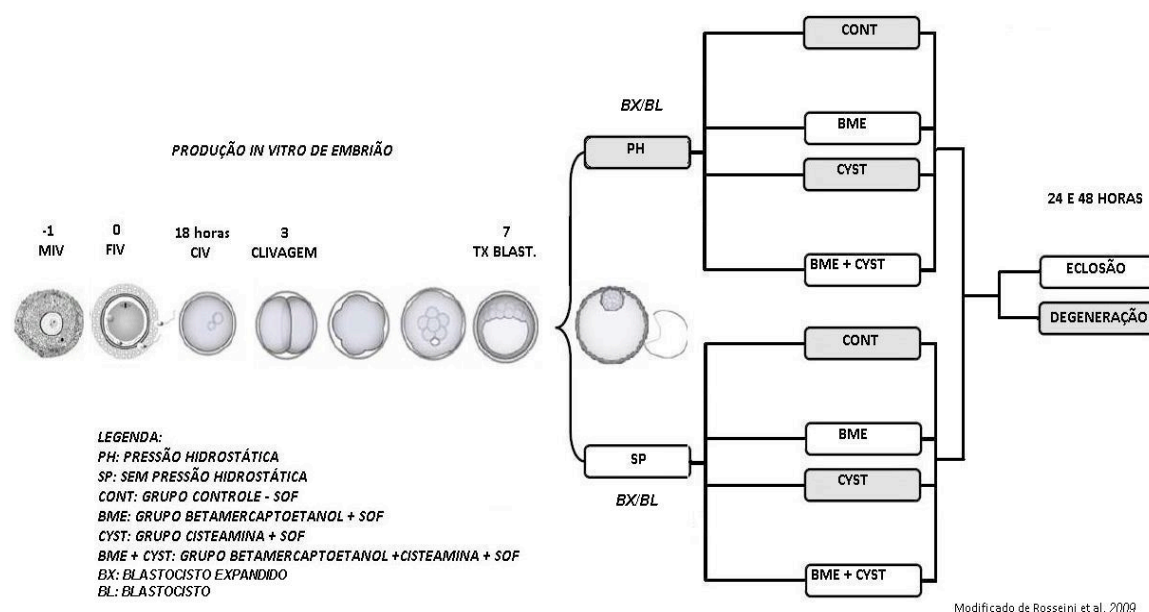


FIGURA 3 - Delineamento do experimento 1.

3.4.2 – Experimento 2 – Efeito dos antioxidantes no desenvolvimento embrionário pós vitrificação.

Esse experimento avaliou o efeito da adição de diferentes antioxidantes no meio de cultivo pós vitrificação.

O delineamento é similar ao experimento 1, entretanto, após o período de uma hora de cultivo pós pressão, os embriões foram submetidos ao processo de vitrificação conforme descrito anteriormente. Os embriões do grupo SEM permaneceram 1,5 h em cultivo sendo então vitrificados. Os parâmetros avaliados foram: taxa de eclosão e taxa de degeneração com 12, 24, 48 e 72 horas após o aquecimento.

3.4.3 – Experimento 3 – Antioxidante na taxa de prenhez de embriões vitrificados.

A partir dos resultados do experimento 2, dois grupos foram escolhidos para avaliar a taxa de prenhez: COM+CONT e COM+BME.

Foram utilizados 55 embriões produzidos a partir de ovócitos de abatedouro, inseminados com a mesma partida de um mesmo touro. Os BX de qualidade 1 foram divididos aleatoriamente em 3 grupos:

- 1- GRUPO CONTROLE FRESCO (CONT. FRESCO): Embriões produzidos *in vitro* e transferidos à fresco.
- 2- GRUPO CONTROLE VITRIFICADO (CONT. VITRIF): Embriões vitrificados e aquecidos conforme já descrito. Permaneceram 12 horas em cultivo antes da transferência.
- 3- GRUPO BME (BME): Embriões vitrificados e aquecidos conforme já descrito. Permaneceram 12 horas em cultivo com suplementação de 100µM de betamercaptoetanol antes da transferência.

Todos os embriões foram envasados em H-SOF para a transferência.

As receptoras foram previamente sincronizadas e receberam embrião em D7, considerando o dia do cio como D0. Nesse experimento foi avaliada a taxa de prenhez com 30 dias e 60 dias.

3.4.4 Transferência de embriões em escala comercial

A partir desses dados de prenhez, a empresa onde o experimento foi realizado adotou o protocolo com o BME e passou a utilizá-lo como rotina nos embriões vitrificados. Foram realizadas 79 transferências comerciais, onde se primou por manter ao máximo o princípio da aleatoriedade. Ou seja, os embriões de cada acasalamento, raça, dentre outros fatores foram divididos em dois grupos; controle vitrificado (CONT. VIT) e BME VIT.

3.4.5 Análise estatística

Todas as análises foram avaliadas utilizando o programa Prophet, versão 5.0 (BBN Systems and Technologies, 1997).

Os dados relativos à taxa de eclosão e degeneração para os diferentes antioxidantes foram comparados utilizando o teste de *Kruskal-Wallis*. Os dados relativos ao efeito da pressão hidrostática assim como estágio embrionário foram comparados utilizando o teste de *Mann-Whitney*. Os resultados de taxa de prenhez foram submetidos ao teste Chi- quadrado (χ^2) . Foram consideradas significativas diferenças com $P < 0,05$. Os resultados foram expressos em média \pm D.P.

4. RESULTADOS

Foram utilizados 4560 ovócitos e produzidos 1924 blastocistos (42,2%) nos 3 experimentos, divididos conforme demonstra a Tabela 1. Entretanto, apenas embriões de qualidade I foram considerados para os experimentos.

TABELA 1 – Produção total de embriões nos 3 experimentos.

EXPERIMENTO	OVÓCITOS	CLIV.	%	EMB.	%
1- TOXICIDADE	1793	1455	81,1	701	39,1
2- VITRIFICAÇÃO	2445	1355	85,8	1088	44,5
3- TAXA DE PRENHEZ	322	254	79	135	41,9

CLIV= taxa de clivagem

EMB= taxa de produção de BX e BL

4.1 Experimento 1

No experimento 1 foram realizadas 6 repetições, totalizando 489 embriões.

Os parâmetros avaliados foram taxa de eclosão e degeneração em 24 e 48 horas de blastocistos expandidos (BX) e blastocistos (BL) (Tabela 2).

TABELA 2 – Efeito da toxicidade dos antioxidantes associado à pressão hidrostática.

GRUPO	PRESSÃO	EMBRIÃO	N	TAXA DE ECLOSÃO (MÉDIA ± D.P) %		TAXA DE DEGENERAÇÃO (MÉDIA ± D.P) %	
				24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
CONTROLE	SEM	BX	40	75,20 (± 10,03) ^A	93,06 (± 11,08) ^A	0	2,78 (± 6,80) ^A
		BL	16	26,11 (± 29,85) ^B	91,11 (± 14,40) ^B	0	8,89 (± 14,40) ^B
	COM	BX	43	74,31 (± 23,78) ^A	89,03 (± 13,75) ^A	0 ^A	5,42 (± 8,72) ^A
		BL	17	13,89 (± 22,15) ^B	44,44 (± 32,77) ^B	13,89 (± 22,15) ^B	36,11 (± 42,71) ^B
BME	SEM	BX	43	90,35 (± 8,06) ^A	97,92 (± 5,10) ^A	0	0 ^A
		BL	18	20,0 (± 24,49) ^B	87,5 (± 20,92) ^B	0	4,17 (± 10,21) ^B
	COM	BX	44	81,12 (± 19,12) ^A	97,92 (± 5,10) ^A	0	0 ^A
		BL	19	19,72 (± 24,50) ^B	84,17 (± 20,10) ^B	0	4,17 (± 10,21) ^B
CYST	SEM	BX	42	68,04 (± 23,59) ^A	89,82 (± 8,28) ^A	0 ^A	0 ^A
		BL	19	8,33 (± 20,41) ^B	52,50 (± 33,73) ^B	8,33 (± 20,41) ^B	25,0 (± 22,36) ^B
	COM	BX	44	69,62 (± 11,03) ^A	93,68 (± 6,99) ^A	0 ^A	4,23 (± 6,63) ^A
		BL	20	12,22 (± 19,05) ^B	71,67 (± 40,21) ^B	8,33 (± 20,41) ^B	8,33 (± 20,41) ^B
BME + CYST	SEM	BX	43	76,89 (± 10,58) ^A	94,58 (± 8,72) ^A	0	5,42 (± 8,72) ^A
		BL	19	21,39 (± 19,45) ^B	61,39 (± 23,34) ^B	0	3,33 (± 8,16) ^B
	COM	BX	44	82,78 (± 13,27) ^A	97,62 (± 5,83) ^A	0 ^A	2,38 (± 5,83) ^A
		BL	18	35,28 (± 24,50) ^B	80,0 (± 40,0) ^B	3,33 (± 8,16) ^B	3,33 (± 8,16) ^B

(A,B) Diferentes sobrescritos na coluna diferem significativamente.

Os valores de eclosão e degeneração não diferiram entre os grupos quando se considera o estágio embrionário, ou seja, BX e BL. Entretanto, ao confrontá-los entre si, nota-se uma significância estatística, conforme simplifica a Figura 4, porém sem a influência dos tratamentos.

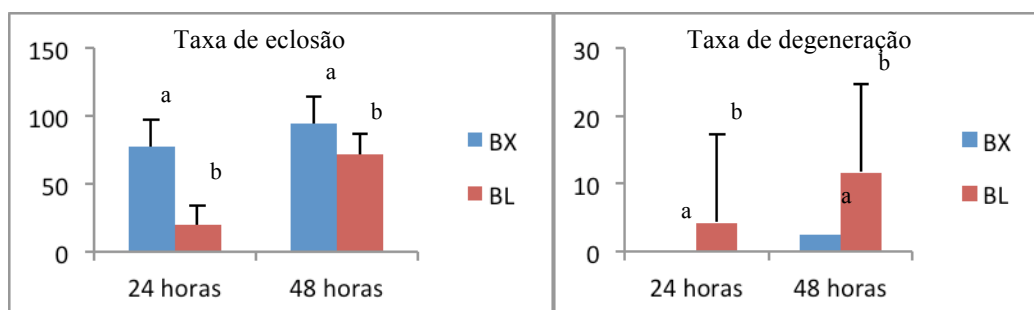


FIGURA 4: Taxa de eclosão e degeneração de BX e BL em diferentes momentos de cultivo após adição de antioxidantes – experimento 1

(a,b) Diferentes sobrescritos na coluna diferem significativamente

A taxa de eclosão média dos BX ficou em 77,2% com 24 horas e em 19,6% para os BL. Com 48 horas, esses índices foram para 94,2% e 71,6%, respectivamente. A taxa média de degeneração foi maior para o estágio BL, com 4,2% em 24 horas e 11,7% com 48 horas, contra 0 e 4,2% dos embriões BX.

Esses resultados demonstram que não há qualquer tipo de interação entre o uso da pressão hidrostática previamente ao cultivo embrionário com substâncias antioxidante, como o β -mercaptoetanol e a cisteamina.

4.2 Experimento 2

O presente experimento utilizou 664 embriões em oito repetições, divididos e analisados de maneira similar ao experimento 1, entretanto, os embriões foram vitrificados 1 hora após serem submetidos ou não à pressão hidrostática.

A Tabela 3 compila as informações gerais de taxa de eclosão/degeneração nos distintos tratamentos. Ao comparar a variável estágio embrionário, nota-se o mesmo comportamento do experimento 1, onde há uma diferença estatística em praticamente todos os parâmetros avaliados.

As taxas de eclosão e degeneração dos embriões BX foram similares em todos os tratamentos submetidos. De forma resumida, as médias de eclosão dos BX foram de 34,84% com 12 horas de cultivo, 73,19% com 24, 93,34% com 48 e 95,39% com 72 horas. Já as taxas de degeneração foram de 0,5%; 0,52%; 1,36% e 2,63%, respectivamente.

TABELA 3. Efeito dos antioxidantes no desenvolvimento embrionário pós desvitrificação submetidos ou não a pressão hidrostática.

ANTIOXIDANTE	PRESSÃO	EMBRIÃO	N	TAXA DE ECLOSÃO (MÉDIA ± D.P) %				TAXA DE DEGENERAÇÃO (MÉDIA ± D.P) %			
				12 horas	24 horas	48 horas	72 horas	12 horas	24 horas	48 horas	72 horas
CONTROLE VITRIFICADO	SEM	BX	63	34,31 (± 20,30) ^A	77,86 (± 10,71) ^A	95, 14 (± 6,92) ^A	98, 61 (± 3,93) ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A
		BL	16	8,33 (± 23, 57) ^B	14,58 (± 27, 37) ^B	50,0 (± 47,14) ^B	50,0 (± 47,14) ^B	16,67 (± 23, 57) ^B	35,42 (± 44,04) ^B	41,67 (± 49,60) ^B	45,83 (± 46,93) ^B
	COM	BX	63	34,52 (± 19,76) ^A	78, 39 (± 12,10) ^A	93,89 (± 6,82) ^A	95, 28 (± 6,79) ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A	3,33 (± 6,42) ^A
		BL	17	0 ^B	10,42 (± 19,80) ^B	25,0 (± 21,82) ^B	29,17 (± 26,35) ^B	22,92 (± 36,66) ^B	29,17 (± 36,46) ^B	50,0 (± 34,50) ^B	50,0 (± 34,50) ^B
BME	SEM	BX	64	42,66 (± 22,91) ^A	76,19 (± 22,92) ^A	89,09 (± 10,75) ^A	89,09 (± 10,75) ^A	0 ^A	0 ^A	2,78 (± 7,86) ^A	5,56 (± 8,40) ^A
		BL	18	6,25 (± 17,68) ^B	22,92 (± 36,66) ^B	47,92 (± 46,66) ^B	62,50 (± 44,32) ^B	4,17 (± 11,79) ^B	8,33 (± 23,57) ^B	27,08 (± 39,78) ^B	27,08 (± 39,78) ^B
	COM	BX	67	36,67 (± 14,98) ^A	74,35 (± 8,29) ^A	98,86 (± 3,21) ^A	98,86 (± 3,21) ^A	0	0 ^A	0 ^A	1,14 (± 3,21) ^A
		BL	18	0 ^B	27,08 (± 35,57) ^B	39,58 (± 41,73) ^B	52,08 (± 43,13) ^B	0	12,50 (± 23,15) ^B	35,42 (± 44,04) ^B	43,75 (± 42,67) ^B
CYST	SEM	BX	65	35,86 (± 15,52) ^A	76,24 (± 18,95) ^A	96,83 (± 5,94) ^A	98,21 (± 5,05) ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A
		BL	19	18,75 (±25,88) ^B	25,0 (± 37,80) ^B	64,58 (± 30,13) ^B	79,17 (± 29,21) ^B	6,25 (± 17,68) ^B	6,25 (± 17,68) ^B	6,25 (± 17,68) ^B	6,25 (± 17,68) ^B
	COM	BX	66	29,27 (± 24,73) ^A	63,22 (± 13,51) ^A	88,13 (± 8,09) ^A	92,87 (± 8,0) ^A	2,08 (± 5,89) ^A	2,08 (± 5,89) ^A	4,61 (± 6,70) ^A	5,74 (± 8,17) ^A
		BL	20	4,17 (± 11,79) ^B	10,42 (± 19,80) ^B	52,08 (± 33,85) ^B	56,25 (± 21,71) ^B	10,42 (±19,80) ^B	10,42 (± 19,80) ^B	16,67 (± 23,57) ^B	25,0 (± 28,17) ^B
CYST + BME	SEM	BX	65	28,52 (± 20,55) ^A	64,16 (± 16,61) ^A	92,31 (± 9,28) ^A	93,70 (± 9,52) ^A	0 ^A	0 ^A	1,39 (± 3,93) ^A	3,17 (± 5,94) ^A
		BL	19	6,25 (± 17,68) ^B	39,58 (± 32,04) ^B	79,17 (± 23,15) ^B	79,17 (± 23,15) ^B	10,42 (± 19,80) ^B	10,42 (± 19,80) ^B	10,42 (± 19,80) ^B	10,42 (± 19,80) ^B
	COM	BX	66	36,93 (± 16,42) ^A	75,14 (± 13,22) ^A	92,44 (± 6,62) ^A	96,53 (± 6,60) ^A	2,08 (± 5,89) ^A	2,08 (± 5,89) ^A	2,08 (± 5,89) ^A	2,08 (± 5,89) ^A
		BL	18	6,25 (± 17,68) ^B	18,75 (± 25,88) ^B	72,92 (± 23,46) ^B	72,92 (± 23,46) ^B	4,17 (± 11,79) ^B	4,17 (± 11,79) ^B	4,17 (± 11,79) ^B	8,33 (± 15,43) ^B

(A,B) Diferentes sobrescritos na coluna diferem significativamente.

BME: 100 µM de beta-mercaptoetanol

CYST: 100µM de cisteamina

BME + CYST: 100µM de beta-mercaptoetanol + 100µM de cisteamina

Ao avaliar apenas BL, nota-se um efeito positivo do uso de antioxidante quando comparado ao controle. De acordo com a Tabela 4, o grupo BME + CYST foi significativamente superior ao grupo controle dentro dos parâmetros 48 e 72 para eclosão e 24, 48 e 72 horas para degeneração.

Ainda especificamente neste estágio embrionário, há uma diferença nos grupos submetidos à pressão hidrostática na avaliação - eclosão 72 horas, onde o grupo não submetido ao estresse foi superior (Figura e Tabela 5).

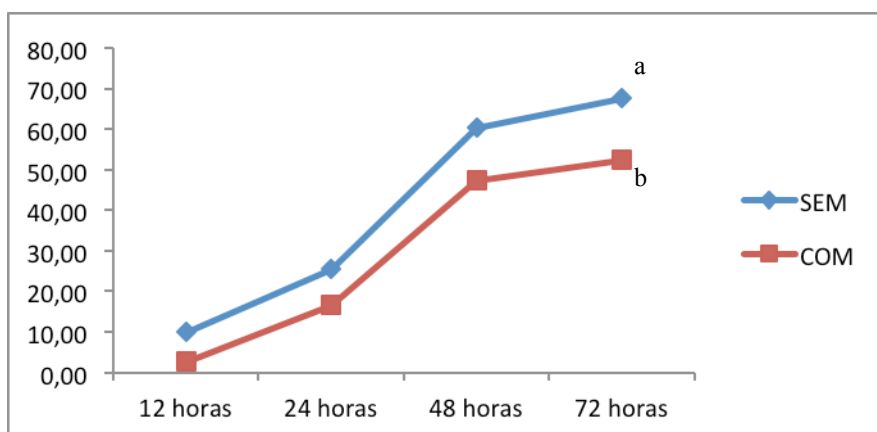


FIGURA 5. Taxa de eclosão pós vitrificação de BL submetidos ou não à pressão hidrostática

(a,b) Diferentes sobrescritos diferem significativamente.

SEM – não passou pela pressão hidrostática;

COM – passou por 1 hora de pressão hidrostática com 60 MPa.

Quando os diversos grupos de antioxidantes são avaliados como um só, o resultado foi ainda mais expressivo nos embriões BL. Há uma diminuição significativa na degeneração embrionária em todos os momentos avaliados quando o antioxidante é adicionado no cultivo pós desvitrificação. A taxa de eclosão também foi influenciada positivamente nos tempos 48 e 72 horas (Figura 6).

TABELA 4. Efeito dos antioxidantes no desenvolvimento de blastocistos (BL) pós vitrificação.

ANTIOXIDANTE	PRESSÃO	N	TAXA DE ECLOSÃO (MÉDIA ± D.P) %				TAXA DE DEGENERAÇÃO (MÉDIA ± D.P) %			
			12 horas	24 horas	48 horas	72 horas	12 horas	24 horas	48 horas	72 horas
CONTROLE VITRIFICADO	SEM	16	8,33 (± 23, 57)	14,58 (± 27, 37)	50,0 (± 47,14) ^A	50,0 (± 47,14) ^A	16,67 (± 23, 57)	35,42 (± 44,04) ^A	41,67 (± 49,60) ^A	45,83 (± 46,93) ^A
	COM	17	0	10,42 (± 19,80)	25,0 (± 21,82) ^A	29,17 (± 26,35) ^A	22,92 (± 36,66)	29,17 (± 36,46) ^A	50,0 (± 34,50) ^A	50,0 (± 34,50) ^A
BME	SEM	18	6,25 (± 17,68)	22,92 (± 36,66)	47,92 (± 46,66) ^{AB}	62,50 (± 44,32) ^{AB}	4,17 (± 11,79)	8,33 (± 23,57) ^{AB}	27,08 (± 39,78) ^{AB}	27,08 (± 39,78) ^{AB}
	COM	18	0	27,08 (± 35,57)	39,58 (± 41,73) ^{AB}	52,08 (± 43,13) ^{AB}	0	12,50 (± 23,15) ^{AB}	35,42 (± 44,04) ^{AB}	43,75 (± 42,67) ^{AB}
CYST	SEM	19	18,75 (±25,88)	25,0 (± 37,80)	64,58 (± 30,13) ^{AB}	79,17 (± 29,21) ^A	6,25 (± 17,68)	6,25 (± 17,68) ^{AB}	6,25 (± 17,68) ^{AB}	6,25 (± 17,68) ^{AB}
	COM	20	4,17 (± 11,79)	10,42 (± 19,80)	52,08 (± 33,85) ^{AB}	56,25 (± 21,71) ^A	10,42 (±19,80)	10,42 (± 19,80) ^{AB}	16,67 (± 23,57) ^{AB}	25,0 (± 28,17) ^{AB}
CYST + BME	SEM	19	6,25 (± 17,68)	39,58 (± 32,04)	79,17 (± 23,15) ^B	79,17 (± 23,15) ^B	10,42 (± 19,80)	10,42 (± 19,80) ^B	10,42 (± 19,80) ^B	10,42 (± 19,80) ^B
	COM	18	6,25 (± 17,68)	18,75 (± 25,88)	72,92 (± 23,46) ^B	72,92 (± 23,46) ^B	4,17 (± 11,79)	4,17 (± 11,79) ^B	4,17 (± 11,79) ^B	8,33 (± 15,43) ^B

(A,B) Diferentes sobrescritos na coluna diferem significativamente.

TABELA 5. Efeito da pressão hidrostática no desenvolvimento de blastocistos (BL) pós vitrificação.

PRESSÃO	N	TAXA DE ECLOSÃO (MÉDIA ± D.P) %				TAXA DE DEGENERAÇÃO (MÉDIA ± D.P) %			
		12 horas	24 horas	48 horas	72 horas	12 horas	24 horas	48 horas	72 horas
SEM	72	9.89 (± 21.11)	25.52 (± 33.33)	60.41 (± 38.51)	67.70 (± 37.61) ^A	9.37 (± 18.42)	15.10 (± 29.44)	21.35 (± 35.73)	22.39 (± 35.57)
COM	73	2.60 (± 10.46)	16.66 (± 25.75)	47.39 (± 34.68)	52.60 (± 32.55) ^B	9.37 (± 22.38)	14.06 (± 25.08)	26.56 (± 34.36)	31.77 (± 34.49)

(A,B) Diferentes sobrescritos na coluna diferem significativamente

SEM – não passou pela pressão hidrostática;

COM – passou por 1 hora de pressão hidrostática com 60 MPa.

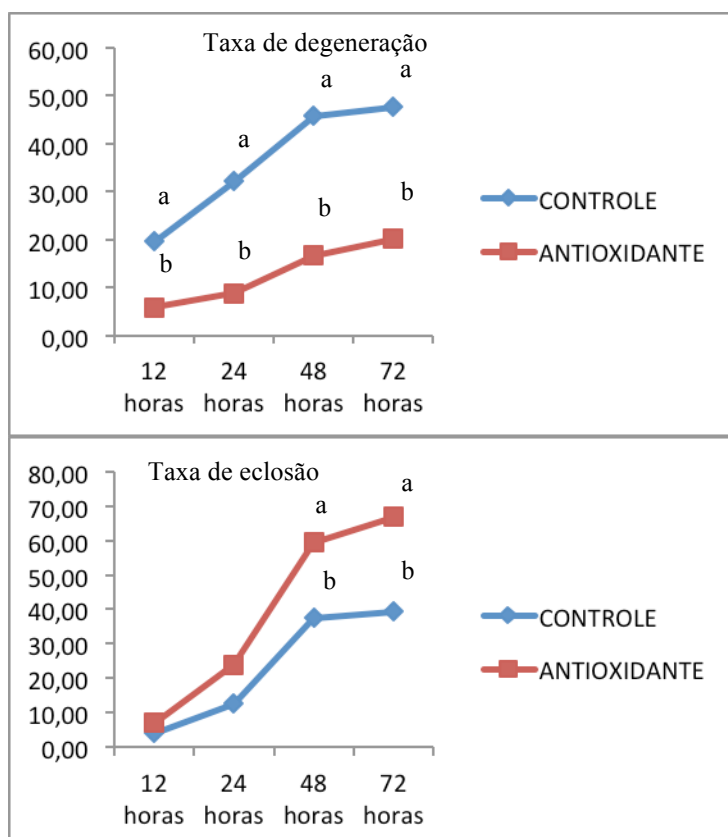


FIGURA 6 - Efeito do fator “antioxidante na taxa de eclosão e degeneração de BL bovinos produzidos *in vitro*.
(a,b) Diferentes sobrescritos diferem significativamente

4.3 Experimento 3

Nesse experimento, os BX foram divididos aleatoriamente em 3 grupos: CONT. FRESCO; CONT. VIT e BME VIT.

Todos os embriões foram submetidos à pressão hidrostática antes da vitrificação.

Duas repetições foram feitas nessa etapa e um total de 55 embriões foram transferidos (Tabela 6). O diagnóstico de gestação foi feito aos 30 e 60 dias pós TE.

TABELA 6 – Taxa de prenhez de embriões vitrificados, cultivados ou não com antioxidante.

GRUPO	N	P30	%	P60	%
CONT. FRESCO	18	9	50	7	38,9
CONT. VIT.	18	4	22,2	3	16,7
BME. VIT.	19	7	36,8	6	31,6

CONT= grupo controle

VIT= vitrificado

BME= 100 µM de beta-mercaptoetanol

P30= taxa de prenhez aos 30 dias

P60= taxa de prenhez aos 60 dias

A partir desses dados de prenhez, a empresa onde o experimento foi realizado adotou o protocolo com o BME e passou a utilizá-lo como rotina nos embriões vitrificados. Foram realizadas 79 transferências comerciais (Tabela 7).

TABELA 7 – Taxa de prenhez aos 60 dias de embriões desvitrificados, cultivados ou não com betamercaptoetanol em um sistema comercial.

GRUPO	N	PRENHEZ	%
CONTROLE VITRIF.	40	12	30
BME	39	14	35,9

5. DISCUSSÃO

Na primeira etapa desse trabalho objetivou-se avaliar o comportamento dos embriões, em distintos estágios, submetidos ou não a PH, suplementados com antioxidante no meio de cultivo pós aplicação de pressão.

Os resultados mostraram que não houve interação entre o uso da PH seguido de cultivo embrionário com substâncias antioxidantes. O uso da PH não influenciou a taxa de eclosão e de degeneração nesse primeiro experimento. Siqueira-filho (2009) testou diferentes tipos de pressão e tempo em embriões bovinos. Observou uma significativa melhora na taxa de eclosão com 48 horas nos embriões submetidos a PH por 1 hora e 60MPa. Em ovinos, resultados similares foram descritos por Bogliolo (2010). Sabe-se que o uso da PH aumenta a expressão gênica global, inclusive de genes relacionados ao estresse oxidativo (SIQUEIRA FILHO *et al.*, 2011). Por esse motivo, uma melhoria nos embriões submetidos à pressão hidrostática quando comparado ao grupo controle é esperada, fato que não foi observado no presente trabalho.

Quando a variável estágio embrionário (BX vs. BL) foi levada em consideração, houve significância em todos os parâmetros analisados, como demonstra a Figura 4. Além do número de blastômeros viáveis, a cinética de desenvolvimento embrionário é um dos parâmetros usados para competência ovocitária, o que explicaria o comportamento dos dados obtidos de estágio embrionário. (RIZOS *et al.*, 2002). A Tabela 2 mostra a diferença nas taxas de eclosão e degeneração entre BX e BL.

Siqueira filho (2009) obteve índices de eclosão de 31,25% nos blastocistos expandidos na avaliação “24 horas pós desvitrificação”. No experimento 2 do presente estudo, a taxa de eclosão mensurada no mesmo momento foi de 78,39% para o grupo controle submetido à pressão. O protocolo da PH utilizado foi o mesmo, entretanto, a metodologia empregada para a vitrificação foi baseada nos trabalhos de Kuwayama *et al.*, (2005). O material de suporte para a criopreservação foi o “criotop” e não o *open pulled straw* – OPS (VAJTA *et al.*, 1998). Essas mudanças foram de grande relevância para a melhoria nas taxas avaliadas em embriões BX. Em contra partida, os resultados de eclosão para BL relatados pelo mesmo autor mostraram uma melhor eficiência (50% em 48 horas *versus* 25% do presente

trabalho). Isso leva a crer em um possível efeito deletério na metodologia aplicada para vitrificar os embriões BL e sustenta, concomitantemente, o resultado paradoxal encontrado na utilização da pressão hidrostática (Figura 5).

A pressão hidrostática não foi determinante no experimento 1 nem no 2, exceto pela taxa de eclosão “72 horas” encontrada no estágio BL (67,70% sem PH *versus* 52,60% com PH). Esse dado é bastante contraditório com a literatura. Pribenszky e Vajta (2011) compilaram diversos resultados atribuídos ao uso da PH em embriões de camundongos, bovinos, ovinos onde exibem melhorias devido à pressão, fato que não se aplica nesse estudo. Quando se trabalha com embriões de alta qualidade, tem-se um maior número de blastômeros, um botão embrionário mais evidente e um menor número de células extrusas e/ou apoptóticas (RIZOS *et al.*, 2002). Isso torna o embrião mais resistente ao processo de criopreservação, dispensando assim, a utilização de agentes estressores prévios, como a PH. Partindo da mesma linha de raciocínio, blastocistos possuem uma sobrevivência pós desvitrificação bastante reduzida. Manipulações excessivas nesses embriões podem ser prejudiciais, o que explicaria o melhor resultado de BL “72 horas” sem PH do experimento 2.

Ao analisar apenas os blastocistos expandidos nota-se uma similaridade nos resultados, independentemente do tratamento pelo qual foi submetido (pressão e/ou antioxidante - Tabela 3). Com isso, o parâmetro “estágio embrionário” deve ser levado em consideração no momento em que o embrião será vitrificado, uma vez que os dados discriminados neste estudo mostram benefícios dessas ferramentas apenas em embriões BL.

O processo de criopreservação danifica boa parte dos blastômeros e, conseqüentemente, minimiza a viabilidade dos embriões. Isso se deve ao fato do embrião adquirir uma fragilidade estrutural após esse processo, principalmente por ficar mais susceptível a ação dos radicais livres - ROS (CAAMANO *et al.*, 1996; FEUGANG *et al.*, 2004). Injúrias na membrana e destruição da viabilidade celular têm sido associadas ao estresse oxidativo (ALI *et al.*, 2003). Tal estresse é conseqüência de um desbalanço entre produção/remoção desses agentes estressores – responsáveis por induzir uma vulnerabilidade mais acentuada em embriões criopreservados (HALLIWELL *et al.*, 1992). Compostos tiol de baixo peso molecular, como a cisteamina e o β -mercaptoetanol ajudam a manter o estado redox

nas células e protegem contra danos oxidativos (CHANCE *et al.*, 1979). Portanto, a utilização de tais compostos durante o cultivo embrionário pode melhorar o desenvolvimento embrionário (BAGIS *et al.*, 2010; HOSSEINI *et al.*, 2009) e a sobrevivência de blastocistos pós desvitrificação (NEDAMBALE *et al.*, 2006).

O presente experimento demonstra claramente a influência da utilização de substâncias antioxidantes nas taxas de sobrevivência embrionária de blastocistos desvitrificados, principalmente em reduzir o índice de embriões degenerados (Figura 6). A taxa de degeneração de BL com 12, 24, 48 e 72 para embriões cultivados com ANTIOXIDANTE foi de 5,9%; 8,68%; 16,67% e 20,14%, respectivamente. Já para os embriões do grupo controle as taxas foram de 19,79%; 32,29%; 45,83% e 47,83% ($p < 0,05$).

Hosseini *et al.*, (2009) demonstraram uma menor taxa de fragmentação de DNA nos embriões suplementados BME durante o cultivo e pós desvitrificação. Nedambale *et al.*, (2006) também citam uma melhoria na sobrevivência de blastocistos desvitrificados e cultivados com BME, independentemente do meio de cultivo utilizado (CR1, KSOM, SOF ou KSOM + SOF). Relatam também uma diminuição no número de células apoptóticas nos embriões cultivados pós desvitrificação com BME. Baseado nos resultados da literatura juntamente com o comportamento similar dos BL no experimento 2, é possível afirmar um efeito extremamente benéfico da suplementação de antioxidante na viabilidade embrionária.

Ao desmembrar o grupo ANTIOXIDANTE, nota-se que o tratamento BME + CYST obteve melhor taxa de eclosão de BL com 48 e 72 horas (76,04%) do que o grupo controle (45,83%). O mesmo ocorre para taxa de degeneração 24 horas, onde o grupo BME + CYST teve 7,29% contra 32,29% do grupo controle. Apesar de diversos trabalhos sugerirem 100µM de BME ou de cisteamina como a concentração ideal para o desenvolvimento embrionário *in vitro* (FEUGANG *et al.*, 2004; NEDAMBALE *et al.*, 2006; TAKAHASHI *et al.*, 1996; TAKAHASHI *et al.*, 2002; ZHOU *et al.*, 2008), o uso concomitante de 2 compostos tiol mostrou-se mais eficiente. O mecanismo de ação do β-mercaptoetanol e da cisteamina é o mesmo (DELEUZE e GOUDET, 2010; ISHII, BANNAI, *et al.*, 1981). Ambos aumentam a captação de cisteína pela célula e, conseqüentemente, a síntese de glutatona. Em uma revisão sobre cisteamina, Deleuze e Goudet (2010) citam que a produção de glutatona

aumenta durante a maturação, atingindo o pico quando o ovócito chega em metáfase II. Entretanto, ela cai consideravelmente no começo do desenvolvimento embrionário. Posto isso e partindo de um pressuposto de que o BME possui um potencial antioxidante maior (em sua composição há um radical hidroxila -OH na extremidade, o que o torna extremamente reativo (SILVA *et al.*, 2011)) o grupo BME + CYST foi melhor por possuir uma concentração maior de antioxidantes. Especula-se que enquanto o BME eliminava os radicais livres por sua hidroxila, a cisteamina aumentava a captação de cisteína pelos blastômeros.

Cabe ressaltar, que nenhum dos tratamentos foi responsável por melhorias em embriões BX. Como citado anteriormente, a cinética de desenvolvimento embrionário possui alta correlação com qualidade embrionária. Os embriões vitrificados em D7 encontravam-se, em sua maioria, no estágio de blastocisto expandido (78%). A criotolerância, o número de células, taxa de eclosão e degeneração são melhores nesse grupo embrionário. Portanto, ao criopreservar embriões, o objetivo de tal procedimento deve ser muito claro, uma vez que recomenda-se vitrificar os melhores embriões (o estágio embrionário é um ponto a se considerar nesse momento). Para conservação de germoplasma animal de raças ameaçadas de extinção e para vacas com mérito genético comprovado e com pouca produção de embrião, a criopreservação de BL são justificáveis. Logo, os resultados aqui demonstrados e discutidos possuem interessante aplicação.

A terceira etapa desse trabalho consistiu em transferir os embriões e avaliar a taxa de prenhez com 30 e 60 dias. A escolha do BME para representar o tratamento ANTIOXIDANTE foi pelo potencial de neutralização de ROS. Sabe-se que a hidroxila dessa molécula é altamente reativa. Todos os embriões foram submetidos a 60 minutos de PH, com 60MPa. Os resultados não diferiram entre si (Tabela 6). O número de transferências não foi suficientemente alto para uma precisa avaliação estatística. Entretanto, ao observar a taxa de prenhez, nota-se um índice satisfatório para embriões produzidos *in vitro* criopreservados. A partir desses números, uma quarta etapa foi proposta – transferir embriões de clientes GENEAL seguindo a mesma metodologia proposta no experimento 3. Um total de 79 embriões foi transferido (Tabela 7). Os embriões BX de cada acasalamento foram igualmente divididos para o grupo controle e BME, para evitar um possível efeito individual. Os índices de prenhez aos 60 dias foram de 35,9% e 30% (BME e controle,

respectivamente). A taxa de aproveitamento dos embriões vitrificados GENEAL com relação aos transferidos foi de 81,5% (79/97). O número de TE foi aquém do mínimo necessário para obter uma informação estatisticamente precisa. O grande entrave de desenvolver pesquisas com taxas de prenhez consiste no modelo trabalhado, pois o custo de manutenção de receptoras e outros fatores tornam essa etapa altamente onerosa. Ao juntar as informações de todas as transferências - 134, os índices gestacionais são extremamente satisfatórios (34,5% - BME; 38,9% - Fresco e 26% - Controle vitrificado) quando comparados aos dados da literatura: Stewart *et al.*, (2011) – 25,7%; Block *et al.*, (2010) – 27,7%; Akiyama *et al.*, (2010) – 34,8%.

A influência da adição de antioxidante foi relevante apenas para os embriões BL. Uma etapa a ser seguida baseia-se em vitrificar os BL em D6, desvitrificá-los e cultivá-los por 12 horas suplementadas ou não de antioxidante para posterior avaliação nas taxas de prenhez. Dessa forma, a cinética de desenvolvimento embrionário seria mais condizente - uma vez que a presença de blastocistos no sexto dia de cultivo é um bom indicativo de qualidade embrionária – e o real efeito dos antioxidantes poderia ser analisado. Em uma possível constatação dos resultados, essa proposta facilitaria muito a logística de TE para embriões vitrificados, pois dispensaria a necessidade de um técnico ir a campo apenas para desvitrificar os embriões. O médico veterinário responsável pela TE somente teria de envasá-los.

6. CONCLUSÕES

O parâmetro “estágio embrionário” deve ser levado em consideração no momento em que o embrião será vitrificado, uma vez que os dados discriminados neste estudo mostram benefícios dessas ferramentas apenas em embriões BL.

São necessários testes complementares como análise da expressão gênica de fatores relacionados ao estresse oxidativo, mensuração de radicais livres na gota de cultivo, transferência de um maior número de embriões para que se alcance um desfecho mais concreto quanto aos dados demonstrados.

REFERÊNCIAS.

- AGCA, Y.; MONSON, R. L.; NORTHEY, D. L.; MAZNI, O. A.; SCHAEFER, D. M.; RUTLEDGE, J. J. Transfer of fresh and cryopreserved IVP bovine embryos: normal calving, birth weight and gestation lengths. **Theriogenology**, v. 50, n. 1, p. 147-62, Jul 1 1998.
- AKIYAMA, K.; KOBAYASHI, J.; SATO, Y.; SATA, R.; OHASHI, M.; SASAKI, E.; ODA, Y.; OGAWA, Y.; UEDA, S.; NABENISHI, H.; MATOBA, S. Calf production from vitrified bovine sexed embryos following in-straw dilution. **Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho**, v. 81, n. 4, p. 461-6, Aug 1 2010.
- ALI, A. A.; BILODEAU, J. F.; SIRARD, M. A. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. **Theriogenology**, v. 59, n. 3-4, p. 939-49, Feb 2003.
- BAGIS, H.; AKKOC, T.; TASKIN, C.; ARAT, S. Comparison of different cryopreservation techniques: higher survival and implantation rate of frozen-thawed mouse pronuclear embryos in the presence of beta-mercaptoethanol in post-thaw culture. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 45, n. 6, p. e332-7, Dec 2010.
- BALASUBRAMANIAN, S.; RHO, G. J. Effect of cysteamine supplementation of in vitro matured bovine oocytes on chilling sensitivity and development of embryos. **Animal reproduction science**, v. 98, n. 3-4, p. 282-92, Apr 2007.
- BLOCK, J.; BONILLA, L.; HANSEN, P. J. Efficacy of in vitro embryo transfer in lactating dairy cows using fresh or vitrified embryos produced in a novel embryo culture medium. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 11, p. 5234-42, Nov 2010.
- BOCK, I.; MAMO, S.; POLGAR, Z.; PRIBENSZKY, C. Changes in gene expression of mouse blastocysts treated with high hydrostatic pressure pulse. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 145-146, Jul 2008.
- BOGLIOLO, L.; ARIU, F.; UCCHEDDU, S.; STRINA, A.; ROSATI, I.; ZEDDA, M. T.; LEDDA, S. High Hydrostatic Pressure Treatment Improves the Quality of in Vitro-Produced Ovine Blastocysts. **Reproduction Fertility and Development**, v. 22, n. 1, p. 202-202, 2010.
- BRAD, A. M.; BORMANN, C. L.; SWAIN, J. E.; DURKIN, R. E.; JOHNSON, A. E.; CLIFFORD, A. L.; KRISHER, R. L. Glutathione and adenosine triphosphate content of in vivo and in vitro matured porcine oocytes. **Molecular reproduction and development**, v. 64, n. 4, p. 492-8, Apr 2003.
- CAAMANO, J. N.; RYOO, Z. Y.; THOMAS, J. A.; YOUNGS, C. R. beta-mercaptoethanol enhances blastocyst formation rate of bovine in vitro-matured/in vitro-fertilized embryos. **Biology of reproduction**, v. 55, n. 5, p. 1179-84, Nov 1996.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological reviews**, v. 59, n. 3, p. 527-605, Jul 1979.

CORREA, G. A.; RUMPF, R.; MUNDIM, T. C.; FRANCO, M. M.; DODE, M. A. Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. **Animal reproduction science**, v. 104, n. 2-4, p. 132-42, Mar 3 2008.

CSERMELY, P.; SCHNAIDER, T.; SOTI, C.; PROHASZKA, Z.; NARDAI, G. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. **Pharmacology & therapeutics**, v. 79, n. 2, p. 129-68, Aug 1998.

DE MATOS, D. G.; FURNUS, C. C. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. **Theriogenology**, v. 53, n. 3, p. 761-71, Feb 2000.

DE MATOS, D. G.; FURNUS, C. C.; MOSES, D. F. Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. **Biology of reproduction**, v. 57, n. 6, p. 1420-5, Dec 1997.

DE MATOS, D. G.; HERRERA, C.; CORTVRINDT, R.; SMITZ, J.; VAN SOOM, A.; NOGUEIRA, D.; PASQUALINI, R. S. Cysteamine supplementation during in vitro maturation and embryo culture: a useful tool for increasing the efficiency of bovine in vitro embryo production. **Molecular reproduction and development**, v. 62, n. 2, p. 203-9, Jun 2002.

DELEUZE, S.; GOUDET, G. Cysteamine supplementation of in vitro maturation media: a review. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 45, n. 6, p. e476-82, Dec 2010.

DINNYES, A.; LONERGAN, P.; FAIR, T.; BOLAND, M. P.; YANG, X. Timing of the first cleavage post-insemination affects cryosurvival of in vitro-produced bovine blastocysts. **Molecular reproduction and development**, v. 53, n. 3, p. 318-24, Jul 1999.

DORMANDY, T. L. Free-radical reaction in biological systems. **Annals of the Royal College of Surgeons of England**, v. 62, n. 3, p. 188-94, May 1980.

ELLIS, J. Proteins as molecular chaperones. **Nature**, v. 328, n. 6129, p. 378-9, Jul 30-Aug 5 1987.

EVANS, P.; HALLIWELL, B. Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 884, p. 19-40, Nov 28 1999.

FEUGANG, J. M.; DE ROOVER, R.; MOENS, A.; LEONARD, S.; DESSY, F.; DONNAY, I. Addition of beta-mercaptoethanol or Trolox at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidant agents. **Theriogenology**, v. 61, n. 1, p. 71-90, Jan 1 2004.

- FISCHER, B.; BAVISTER, B. D. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. **Journal of reproduction and fertility**, v. 99, n. 2, p. 673-9, Nov 1993.
- FURNUS, C. C.; DE MATOS, D. G.; PICCO, S.; GARCIA, P. P.; INDA, A. M.; MATTIOLI, G.; ERRECALDE, A. L. Metabolic requirements associated with GSH synthesis during in vitro maturation of cattle oocytes. **Animal reproduction science**, v. 109, n. 1-4, p. 88-99, Dec 2008.
- HALLIWELL, B.; ARUOMA, O. I. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. **FEBS letters**, v. 281, n. 1-2, p. 9-19, Apr 9 1991.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M.; CROSS, C. E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 119, n. 6, p. 598-620, Jun 1992.
- HASLER, J. F. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. **Animal reproduction science**, v. 79, n. 3-4, p. 245-64, Dec 15 2003.
- HOSSEINI, S. M.; FOROUZANFAR, M.; HAJIAN, M.; ASGARI, V.; ABEDI, P.; HOSSEINI, L.; OSTADHOSSEINI, S.; MOULAVI, F.; SAFAHANI LANGRROODI, M.; SADEGHI, H.; BAHRAMIAN, H.; EGHBALSAIED, S.; NASR-ESFAHANI, M. H. Antioxidant supplementation of culture medium during embryo development and/or after vitrification-warming; which is the most important? **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 26, n. 6, p. 355-64, Jun 2009.
- ISHII, T.; BANNAI, 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 biological chemistry**, v. 256, n. 23, p. 12387-92, Dec 10 1981.
- ISHII, T.; HISHINUMA, I.; BANNAI, S.; SUGITA, Y. Mechanism of growth promotion of mouse lymphoma L1210 cells in vitro by feeder layer or 2-mercaptoethanol. **Journal of cellular physiology**, v. 107, n. 2, p. 283-93, May 1981.
- ISHIKAWA, M. [Oxygen radicals-superoxide dismutase system and reproduction medicine]. **Nihon Sanka Fujinka Gakkai zasshi**, v. 45, n. 8, p. 842-8, Aug 1993.
- IWASAKI, S.; YOSHIBA, N.; USHIJIMA, H.; WATANABE, S.; NAKAHARA, T. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized in vitro and in vivo. **Journal of reproduction and fertility**, v. 90, n. 1, p. 279-84, Sep 1990.
- JOHNSON, M. H.; NASR-ESFAHANI, M. H. Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos in vitro? **BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 16, n. 1, p. 31-8, Jan 1994.
- JU, J. C.; PARKS, J. E.; YANG, X. Thermotolerance of IVM-derived bovine oocytes and embryos after short-term heat shock. **Molecular reproduction and development**, v. 53, n. 3, p. 336-40, Jul 1999.

- KITAGAWA, Y.; SUZUKI, K.; YONEDA, A.; WATANABE, T. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. **Theriogenology**, v. 62, n. 7, p. 1186-97, Oct 1 2004.
- KODAMAN, P. H.; BEHRMAN, H. R. Endocrine-regulated and protein kinase C-dependent generation of superoxide by rat preovulatory follicles. **Endocrinology**, v. 142, n. 2, p. 687-93, Feb 2001.
- KULTZ, D. Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous function. **The Journal of experimental biology**, v. 206, n. Pt 18, p. 3119-24, Sep 2003.
- KUWAYAMA, M.; VAJTA, G.; KATO, O.; LEIBO, S. P. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. **Reproductive biomedicine online**, v. 11, n. 3, p. 300-8, Sep 2005.
- LAFLEUR, M. V.; HOORWEG, J. J.; JOENJE, H.; WESTMIJZE, E. J.; RETEL, J. The ambivalent role of glutathione in the protection of DNA against singlet oxygen. **Free radical research**, v. 21, n. 1, p. 9-17, Jul 1994.
- LIN, L.; KRAGH, P. M.; PURUP, S.; KUWAYAMA, M.; DU, Y.; ZHANG, X.; YANG, H.; BOLUND, L.; CALLESEN, H.; VAJTA, G. Osmotic stress induced by sodium chloride, sucrose or trehalose improves cryotolerance and developmental competence of porcine oocytes. **Reproduction, fertility, and development**, v. 21, n. 2, p. 338-44, 2009.
- LIU, L.; TRIMARCHI, J. R.; NAVARRO, P.; BLASCO, M. A.; KEEFE, D. L. Oxidative stress contributes to arsenic-induced telomere attrition, chromosome instability, and apoptosis. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 34, p. 31998-2004, Aug 22 2003.
- LUBERDA, Z. The role of glutathione in mammalian gametes. **Reproductive biology**, v. 5, n. 1, p. 5-17, Mar 2005.
- MACHADO, G. M.; CARVALHO, J. O.; FILHO, E. S.; CAIXETA, E. S.; FRANCO, M. M.; RUMPF, R.; DODE, M. A. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 71, n. 8, p. 1289-97, May 2009.
- MEISTER, A.; TATE, S. S. Glutathione and related gamma-glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. **Annual review of biochemistry**, v. 45, p. 559-604, 1976.
- MENTRE, P.; HUI BON HOA, G. Effects of high hydrostatic pressures on living cells: a consequence of the properties of macromolecules and macromolecule-associated water. **International review of cytology**, v. 201, p. 1-84, 2001.
- MORATO, R.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, M. T.; MOGAS, T. Cryotops versus open-pulled straws (OPS) as carriers for the cryopreservation of bovine oocytes: effects on spindle and chromosome configuration and embryo development. **Cryobiology**, v. 57, n. 2, p. 137-41, Oct 2008.

NAVARRO, P. A.; LIU, L.; FERRIANI, R. A.; KEEFE, D. L. Arsenite induces aberrations in meiosis that can be prevented by coadministration of N-acetylcysteine in mice. **Fertility and sterility**, v. 85 Suppl 1, p. 1187-94, Apr 2006.

NEDAMBALE, T. L.; DU, F.; YANG, X.; TIAN, X. C. Higher survival rate of vitrified and thawed in vitro produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with beta-mercaptoethanol. **Animal reproduction science**, v. 93, n. 1-2, p. 61-75, Jun 2006.

ORSI, N. M.; LEESE, H. J. Protection against reactive oxygen species during mouse preimplantation embryo development: role of EDTA, oxygen tension, catalase, superoxide dismutase and pyruvate. **Molecular reproduction and development**, v. 59, n. 1, p. 44-53, May 2001.

PABON, J. E., JR.; FINDLEY, W. E.; GIBBONS, W. E. The toxic effect of short exposures to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. **Fertility and sterility**, v. 51, n. 5, p. 896-900, May 1989.

PALOU, E.; LOPEZ-MALO, A.; BARBOSA CANOVAS, G.V.; WELTI-CHANES, J.; SWANSON, B.G. Kinetic analysis of *Zygosaccharomyces bailii* inactivation by high hydrostatic pressure. **Lebensm.-Wiss. U. Technology**, v. 30, p. 703-708, 1997.

PERREAULT, S. D.; WOLFF, R. A.; ZIRKIN, B. R. The role of disulfide bond reduction during mammalian sperm nuclear decondensation in vivo. **Developmental biology**, v. 101, n. 1, p. 160-7, Jan 1984.

POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 164, n. 4172, p. 666, Oct 15 1949.

PRIBENSZKY, C.; MOLNAR, M.; CSEH, S.; SOLTI, L. Survival of mouse blastocysts after low-temperature preservation under high pressure. **Acta veterinaria Hungarica**, v. 52, n. 4, p. 479-87, 2004.

PRIBENSZKY, C.; VAJTA, G. Cells under pressure: how sublethal hydrostatic pressure stress treatment increases gametes' and embryos' performance. **Reproduction, fertility, and development**, v. 23, n. 1, p. 48-55, 2011.

PRIBENSZKY, C.; VAJTA, G.; MOLNAR, M.; DU, Y.; LIN, L.; BOLUND, L.; YOVICH, J. Stress for stress tolerance? A fundamentally new approach in mammalian embryology. **Biology of reproduction**, v. 83, n. 5, p. 690-7, Nov 2010.

PUGH, P. A.; TERVIT, H. R.; NIEMANN, H. Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine in vitro produced embryos, following in straw-dilution, in vitro and in vivo following transfer. **Animal reproduction science**, v. 58, n. 1-2, p. 9-22, Feb 28 2000.

RALL, W. F.; FAHY, G. M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. **Nature**, v. 313, n. 6003, p. 573-5, Feb 14-20 1985.

RATHBUN, W. B.; MURRAY, D. L. Age-related cysteine uptake as rate-limiting in glutathione synthesis and glutathione half-life in the cultured human lens. **Experimental eye research**, v. 53, n. 2, p. 205-12, Aug 1991.

RIOS, G. L.; MUCCI, N. C.; KAISER, G. G.; ALBERIO, R. H. Effect of container, vitrification volume and warming solution on cryosurvival of in vitro-produced bovine embryos. **Animal reproduction science**, v. 118, n. 1, p. 19-24, Mar 2010.

RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-GARNELO, S.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. **Biology of reproduction**, v. 68, n. 1, p. 236-43, Jan 2003.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular reproduction and development**, v. 61, n. 2, p. 234-48, Feb 2002.

SABATINI, L.; WILSON, C.; LOWER, A.; AL-SHAWAF, T.; GRUDZINSKAS, J. G. Superoxide dismutase activity in human follicular fluid after controlled ovarian hyperstimulation in women undergoing in vitro fertilization. **Fertility and sterility**, v. 72, n. 6, p. 1027-34, Dec 1999.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 215, n. 2, p. 213-9, Jul 15 1993.

SILVA, G.M.; ARAÚJO, V.R.; DUARTE, A.B.G.; LOPES, C.A.P.; FIGUEIREDO, J.R. Papel dos antioxidantes no cultivo *in vitro* de células ovarianas. **Revista brasileira de reprodução animal**, v.35, n. 3, p. 315-326, 2011

SIQUEIRA FILHO, E. **Pressão hidrostática: Efeito na vitrificação, ultraestrutura e expressão gênica de embriões bovinos**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2009. Dissertação de mestrado.

SIQUEIRA FILHO, E.; CAIXETA, E. S.; PRIBENSZKY, C.; MOLNAR, M.; HORVATH, A.; HARNOS, A.; FRANCO, M. M.; RUMPF, R. Vitrification of bovine blastocysts pretreated with sublethal hydrostatic pressure stress: evaluation of post-thaw in vitro development and gene expression. **Reproduction, fertility, and development**, v. 23, n. 4, p. 585-90, 2011.

STEWART, B. M.; BLOCK, J.; MORELLI, P.; NAVARETTE, A. E.; AMSTALDEN, M.; BONILLA, L.; HANSEN, P. J.; BILBY, T. R. Efficacy of embryo transfer in lactating dairy cows during summer using fresh or vitrified embryos produced in vitro with sex-sorted semen. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 7, p. 3437-45, Jul 2011.

SUTTON, M. L.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. **Human reproduction update**, v. 9, n. 1, p. 35-48, Jan-Feb 2003.

TAKAHASHI, H.; KUWAYAMA, M.; HAMANO, S.; TAKAHASHI, M.; OKANO, A.; KADOKAWA, H.; KARIYA, T.; NAGAI, T. Effect of B-mercaptoethanol on the viability of IVM/IVF/IVC bovine embryos during long-distance transportation in plastic straws. **Theriogenology**, v. 46, n. 6, p. 1009-15, Oct 15 1996.

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, n. 2, p. 228-32, Aug 1993.

TAKAHASHI, M.; NAGAI, T.; OKAMURA, N.; TAKAHASHI, H.; OKANO, A. Promoting effect of beta-mercaptoethanol on in vitro development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos. **Biology of reproduction**, v. 66, n. 3, p. 562-7, Mar 2002.

TAKAMI, M.; PRESTON, S. L.; BEHRMAN, H. R. Eicosatetraenoic and eicosatrienoic acids, lipoxygenase inhibitors, block meiosis via antioxidant action. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 278, n. 4, p. C646-50, Apr 2000.

TOMINAGA, K. Cryopreservation and sexing of in vivo- and in vitro-produced bovine embryos for their practical use. **The Journal of reproduction and development**, v. 50, n. 1, p. 29-38, Feb 2004.

TSENG, J. K.; TANG, P. C.; JU, J. C. In vitro thermal stress induces apoptosis and reduces development of porcine parthenotes. **Theriogenology**, v. 66, n. 5, p. 1073-82, Sep 15 2006.

UMAOKA, Y.; NODA, Y.; NARIMOTO, K.; MORI, T. Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. **Molecular reproduction and development**, v. 31, n. 1, p. 28-33, Jan 1992.

VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Animal reproduction science**, v. 60-61, p. 357-64, Jul 2 2000.

VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P. J.; JACOBSEN, H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular reproduction and development**, v. 51, n. 1, p. 53-8, Sep 1998.

VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 236-44, Jan 7 2006.

VAN SOOM, A.; VAN VLAENDEREN, I.; MAHMOUDZADEH, A. R.; DELUYKER, H.; DE KRUIF, A. Compaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. **Theriogenology**, v. 38, n. 5, p. 905-19, Nov 1992.

VANDAELE, L.; THYS, M.; BIJTTEBIER, J.; VAN LANGENDONCKT, A.; DONNAY, I.; MAES, D.; MEYER, E.; VAN SOOM, A. Short-term exposure to hydrogen peroxide during oocyte maturation improves bovine embryo development. **Reproduction**, v. 139, n. 3, p. 505-11, Mar 2010.

WEMEKAMP-KAMPHUIS, H. H.; KARATZAS, A. K.; WOUTERS, J. A.; ABEE, T. Enhanced levels of cold shock proteins in *Listeria monocytogenes* LO28 upon exposure to

low temperature and high hydrostatic pressure. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 2, p. 456-63, Feb 2002.

WILMUT, I.; ROWSON, L. E. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. **The Veterinary record**, v. 92, n. 26, p. 686-90, Jun 30 1973.

ZHOU, P.; WU, Y. G.; LI, Q.; LAN, G. C.; WANG, G.; GAO, D.; TAN, J. H. The interactions between cysteamine, cystine and cumulus cells increase the intracellular glutathione level and developmental capacity of goat cumulus-denuded oocytes. **Reproduction**, v. 135, n. 5, p. 605-11, May 2008.