



**UFSM**

**Dissertação de Mestrado**

**PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS COM  
CISTEAMINA**

---

**Daniela Scherer da Silva**

**PPGMV**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2006**

**Daniela Scherer da Silva**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Fisiopatologia da Reprodução, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

**Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mara Iolanda Batistella Rubin**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2006**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, Abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS  
COM CISTEAMINA**

elaborada por  
**Daniela Scherer da Silva**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Medicina Veterinária**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Mara Iolanda Batistella Rubin**  
(Presidente/ Orientadora)

---

**Deila Rosely Schossler**

---

**Mari Lourdes Bernardi**

Santa Maria, 21 de fevereiro de 2006.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, em especial a minha mãe, pelo apoio que recebi na execução desse trabalho. Pelo carinho e compreensão em todos os momentos!

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mara Rubin, minha orientadora, pelos ensinamentos, conselhos, apoio, amizade e confiança.

Ao Prof. Dr. Carlos Antonio Mondino Silva, pela co-orientação. À Bionorte Embriões/RO, pela oportunidade de realizar o trabalho.

Aos pós-graduandos e estagiários do Embryolab, onde tive a oportunidade de trabalhar com produção *in vitro* despertando em mim o interesse pela pesquisa.

Aos colegas e amigos do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária: Mariana Sá e Silva, Daniel Rissi, Ricardo Pozzobon, Marcelo de Lima, Mário Brum, Letícia Frizzo, Raquel Rech e Eduardo Masuda.

À GENTEC BIOTECNOLOGIA ANIMAL por ceder gentilmente o sêmen utilizado no experimento.

Aos frigoríficos FRIBOI e CANDEIAS pela cedência dos ovários.

À Capes pela bolsa de mestrado.

## SUMÁRIO

FOLHA DE ROSTO.....	2
FOLHA DE APROVAÇÃO.....	3
AGRADECIMENTOS.....	4
SUMÁRIO.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	6
RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
3. CAPÍTULO 1. Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos com Cisteamina .....	16
3.1 Resumo.....	17
3.2 Abstract.....	18
3.3 Introdução.....	19
3.4 Material e Método.....	21
3.5 Resultados e discussão.....	23
3.6 Referências.....	29
4. CONCLUSÕES.....	34
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Taxa de produção <i>in vitro</i> de embriões <i>Bos taurus indicus</i> em meio suplementado com 150µM de cisteamina na maturação, fecundação ou cultivo .....	24
Figura 2. Estádio de desenvolvimento embrionário ao sétimo dia de cultivo de embriões <i>Bos taurus indicus</i> produzidos <i>in vitro</i> em meio SOFaaci suplementado com 150µM de cisteamina e SOFaaci sem cisteamina (controle).....	24
Figura 3. Qualidade ao sétimo dia de cultivo de embriões <i>Bos taurus indicus</i> , produzidos <i>in vitro</i> em meio suplementado ou não com 150µM de cisteamina .....	25

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS COM CISTEAMINA

AUTOR: DANIELA SCHERER DA SILVA  
ORIENTADORA: MARA IOLANDA BATISTELLA RUBIN  
Santa Maria, 21 de fevereiro de 2006.

As biotécnicas reprodutivas atuais utilizam como suporte para outros estudos a produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos, conduzida em três etapas igualmente importantes: maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV). Nesta pesquisa avaliou-se o efeito da cisteamina, um componente thiol, nos meios de maturação, fecundação ou de cultivo sobre o desenvolvimento embrionário. Complexos *cumulus*-oócitos (CCO=oócitos) coletados de ovários de vacas *Bos taurus indicus* provenientes de frigorífico foram selecionados e distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: Grupo Controle (sem cisteamina, n=488), Cisteamina na maturação (n=487), Cisteamina na fecundação (n=489) e Cisteamina no cultivo (n=493). Os oócitos dos quatro grupos foram maturados por 24h em TCM-199 modificado acrescido de 0,01UI/mL rFSHh + 0,05mg/mL de LH e 10% de SFB. No grupo cisteamina-maturação, o meio TCM-199 foi suplementado com 150µM de cisteamina. Os oócitos foram maturados a 38,5°C em estufa com 5%CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturada. A FIV (D0=dia da fecundação) foi realizada por 18-22 horas em meio Fert-Talp acrescido de heparina e PHE. Este meio utilizado no grupo cisteamina-fecundação foi adicionado de 150µM de cisteamina. Para capacitação, o sêmen foi descongelado e processado através do Gradiente de Percoll e a inseminação foi realizada com 2x10<sup>6</sup> espermatozóides/mL, nas mesmas condições atmosféricas da MIV. Os prováveis zigotos de todos grupos experimentais foram cultivados em meio SOF suplementado com 5% SFB. No grupo cisteamina-cultivo o meio SOF foi acrescido de 150µM de cisteamina. A atmosfera gasosa nos 8 dias de cultivo foi de 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub> e umidade saturada. A clivagem foi de 86, 89, 88 e 90%, obtendo-se 29, 31, 38 e 35% de blastocistos em D7 e 21, 23, 27 e 29% de eclosão para os grupos controle, maturação, fecundação e cultivo, respectivamente. Em meio de fecundação (Fert-Talp) ou em meio de cultivo (SOFaaci) a cisteamina promove maior produção embrionária. O uso da cisteamina nos programas comerciais de OPU/PIV poderá contribuir para melhor eficiência da produção embrionária.

**Palavras-chave:** Antioxidantes, PIV, bovinos, cisteamina, *Bos taurus indicus*.

## ABSTRACT

Master's Dissertation in Veterinary Medicine  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

## IN VITRO PRODUCTION OF BOVINE EMBRYOS WITH CYSTEAMINE

AUTHOR: DANIELA SCHERER DA SILVA  
ADVISER: MARA IOLANDA BATISTELLA RUBIN  
Santa Maria February 21, 2006.

### ABSTRACT

Advanced reproductive techniques use the 3 phase of *in vitro* production for bovine embryos, i.e. *in vitro* maturation (IVM), *in vitro* fertilization (IVF) and *in vitro* culture (IVC) as support for a variety of studies. This study assessed the effect of cysteamine, a thiol component, on the embryonic development during maturation, fertilization and *in vitro* culture. *Bos taurus indicus* Cumulus-oocyte complexes (COC) obtained from cow ovaries collected at a slaughterhouse were randomly distributed in four groups: control-group (without cysteamine, n=488), cysteamine in maturation (n=487), cysteamine in fertilization (n=489) and cysteamine in the culture medium (n=493). All COC were matured for 24h in TCM-199+0,01IUrFSH/mL+0,05mgLH/mL+10% fetal calf serum (FCS). In the cysteamine-maturation group, the TCM-199 medium was supplemented with 150µM cysteamine. The COC were matured at 38.5°C with 5% of CO<sub>2</sub> in air and humid atmosphere. The IVF (D0=fertilization day) was performed for 18-22h in Talp-Fert medium with heparin and PHE under the same conditions as IVM. The medium of the cysteamine-fertilization group was supplemented with 150µM cysteamine. For sperm capacitation, the semen was thawed, selected by percoll gradient and insemination was done with 2x10<sup>6</sup> spermatozoa/mL. Presumed zygotes from all groups were cultured in SOF + 5% FCS. In the cysteamine culture group the SOF medium was supplemented with 150µM cysteamine. Culture was maintained at 5%CO<sub>2</sub>, 5%O<sub>2</sub>, 90%N<sub>2</sub> and saturated humidity for 8 days. Cleavage rates were 86, 89, 88 and 90 respectively, for control, maturation, fertilization and culture groups. Percentage of blastocyst on D7 were 29, 31, 38 e 35 and blastocyst hatched on D9 were 21, 23, 27 and 29, respectively. This study showed that adding cysteamine to the fertilization or culture medium improve the blastocyst production. Commercial OPU/IVP programs maybe benefit from the use of cysteamine.

**Key Words:** Antioxidants, IVP, bovine, cysteamine, *Bos taurus indicus*.



## 1. INTRODUÇÃO

Nos programas de transferência de embriões bovinos produzidos *in vitro* (PIV), os índices de produção embrionária e a qualidade dos embriões têm fundamental importância para a difusão, sucesso da técnica e melhor entendimento sobre ciência básica. As pesquisas sobre PIV desenvolvidas na década de 90 demonstraram que o estresse oxidativo era um importante entrave para o desenvolvimento embrionário, indicando que compostos hidrogenados no meio de cultivo podem bloquear o desenvolvimento dos embriões (LEGGE & SELLENS, 1991; TAKAHASHI *et al.*, 1993). O efeito do estresse oxidativo pode ser minimizado em várias células com o uso de um sistema antioxidante eficiente (DEL CORSO *et al.*, 1994). A glutatona (GSH) é formada pelos aminoácidos glutamato, glicina e cisteína e sua principal função é proteger a membrana celular inativando os radicais livres. Os primeiros relatos sobre a glutatona e sua relação no processo da PIV foram publicados por CALVIN *et al.* (1986), demonstrando que a mesma é sintetizada durante a maturação de oócitos de camundongos. Outros estudos foram realizados com a avaliação de seu efeito em espermazóides e na maturação de oócitos de hamster (PERREAULT *et al.*, 1988) e na sua identificação em suínos (YOSHIDA *et al.*, 1993). Na seqüência, surgiram as pesquisas pioneiras em bovinos, com informações sobre a concentração de glutatona durante a maturação e a fecundação *in vitro* (MIYAMURA *et al.*, 1995), além de comprovar o estímulo de sua síntese (DE MATOS *et al.* 1996) e efeitos sobre o desenvolvimento e viabilidade no congelamento de embriões.

PERREAULT *et al.* (1988) estudando a maturação do oócito de hamster verificaram que o conteúdo de glutatona no ovário aumenta

próximo à ovulação formando um reservatório para proteger a célula no período pós-fecundação e de desenvolvimento embrionário (TELFORT *et al.*, 1990). Na espécie humana, as espécies reativas de oxigênio afetam múltiplos processos fisiológicos, da maturação à fecundação, desenvolvimento embrionário e gestação. Alguns pesquisadores postulam que o estresse oxidativo modula a queda da fertilidade com a idade (AGARWAL *et al.*, 2005).

A cisteamina é um componente Thiol que está presente no ovário de bovinos, ovinos, caprinos e caninos (GUYADER-JOLY *et al.*, 1998) e sua função é proteger as células contra as radiações ionizantes e neutralizar as espécies reativas de oxigênio através da estimulação da síntese de GSH (GUÉRIN *et al.*, 2001).

O conhecimento disponível ainda não permite uma conclusão definitiva sobre a ação dos antioxidantes nas diferentes etapas da PIV. Há necessidade de esclarecer essa condição e, assim, estabelecer um protocolo de maior eficiência, na qualidade e na produção embrionária. Esta condição poderia no futuro servir de suporte às técnicas de congelamento de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Na realização deste trabalho avaliou-se o efeito da cisteamina nos meios de maturação, fecundação ou cultivo sobre a qualidade e a taxa de produção embrionária ao sétimo dia de cultivo e a taxa de eclosão ao nono dia após a fecundação.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Como a produção *in vitro* de embriões vem sendo aplicada extensivamente na espécie bovina, expressivo número de embriões tem sido destinado para pesquisa. Este fato tem um efeito significativo no conhecimento adquirido sobre a maturação, fecundação e cultivo (GORDON, 2003). O uso de diferentes protocolos torna a produção muito variável, tanto na pesquisa como em programas comerciais. Isto se deve à variação individual dos animais, condições de manejo nos quais estes estão submetidos e ao sistema de cultivo utilizado para a produção dos embriões.

Embriões bovinos são susceptíveis ao estresse oxidativo (LEQUARRE *et al.*, 1999) e vários pesquisadores têm direcionado suas pesquisas neste tema (LUVONI *et al.*, 1994; LIM *et al.*, 1996; CAMAANO *et al.*, 1998; FEUGANG *et al.*, 2003). Estudos similares foram efetuados em suínos e em búfalos (BONI *et al.*, 1992; GASPARRINI *et al.*, 2000). Nos últimos dez anos, os antioxidantes mais pesquisados na produção *in vitro* têm sido a superóxido dismutase, glutatona, taurina,  $\beta$ -mercaptoetanol, cistina, cisteína e cisteamina.

A glutatona (GSH) é um tripeptídeo tiol e também o maior componente sulfidrílico não-protéico da célula dos mamíferos, cujos efeitos sobre a fisiologia e metabolismo intracelular são muito importantes. Ela mantém a célula no estado de redução, protegendo-a contra os efeitos causados pelas lesões oxidativas que resultam em radicais livres, moléculas instáveis por possuírem número ímpar de elétrons. Para atingir a estabilidade estas moléculas reagem com as substâncias que compõem o meio de PIV promovendo assim, a oxidação e, conseqüentemente,

morte das células. Assim, os antioxidantes protegem o organismo da ação danosa dos radicais livres (GASPARINI *et al.*, 2000).

A síntese da glutathione é altamente dependente da disponibilidade de cisteína no meio (ISHII *et al.*, 1981; RATHBUN & MURRAY, 1991). Os efeitos benéficos da cisteína foram relatados na MIV de oócitos (DE MATOS & FURNUS, 2000) e no desenvolvimento de embriões (CAAMANO *et al.*, 1998). Entretanto, a cisteína no meio é facilmente oxidada, formando cistina, um dímero cisteínico, mesmo em meios já estabelecidos para as rotinas de cultivo. Quando a cisteína é oxidada em cistina, alguns tipos de células, como os linfócitos, têm dificuldade de utilizar cistina, resultando no decréscimo de sua proliferação e na concentração intracelular de glutathione (ISHI *et al.*, 1981).

PABON *et al.* (1989) foi um dos pioneiros a detectar no sistema de cultivo *in vitro* que a exposição de embriões de camundongas ao oxigênio atmosférico (20%) por curto período, exerce efeito adverso nos estádios iniciais de desenvolvimento em meio Ham's F-10 livre de proteína, quando comparado com 5% de oxigênio. Em pesquisa similar, TAKEUCHI *et al.* (1989) também relataram a toxicidade do oxigênio antes da clivagem. Subseqüentemente, a equipe de UMAOKA *et al.* (1992) investigou a toxicidade do oxigênio no cultivo *in vitro* com as concentrações de 20% e 5% de O<sub>2</sub>, com ou sem superóxido dismutase (SOD). O desenvolvimento embrionário foi influenciado pela atmosfera de oxigênio, no entanto o efeito prejudicial foi minimizado pela enzima antioxidante SOD.

Em 1991, a equipe liderada por Noda relatou que a SOD atenuava o bloqueio de duas células em embriões de camundongas cultivados *in vitro*, beneficiando o subseqüente desenvolvimento embrionário. No ano seguinte, RIEGER *et al.* (1992) postularam que o entendimento dos mecanismos de produção e eliminação de radicais de oxigênio nos embriões bovinos poderia resultar num aumento significativo da eficiência dos sistemas de cultivo *in vitro*. Estudando o metabolismo da glicose em embriões de 2-células até o estágio de blastocisto expandido ficou

comprovado que através do ciclo das pentoses, há um aumento metabólico de 15 vezes e o metabolismo total duplica (30x) durante o desenvolvimento embrionário. O primeiro pico de aumento não ocorre antes que o embrião esteja entre 8-16 células, ou seja, até que o genoma embrionário não seja ativado. O metabolismo da glutamina é alta no estágio de 2-4 células e se reduz ao mínimo, quando alcança o estágio de mórula compacta e blastocisto. A expansão dos blastocistos foi acompanhada de aumento significativo do metabolismo da glicose e glutamina, refletindo provavelmente o aumento da demanda de energia de  $\text{Na}^{(+)} - \text{K}^{+}$  ATPase necessária para a formação e manutenção da blastocelule.

No início deste século, a síntese da glutathione foi identificada por De MATOS et al. (2000) em oócitos bovinos, mas anteriormente já havia sido relatada em embriões no estágio de 9-16 células (LIM *et al.*, 1996). No estudo de TAYLOR e colaboradores (1992), a adição de glutathione e superóxido dismutase (SOD) ao meio de cultivo de embriões humanos revelou que a glutathione não foi efetiva, no entanto a SOD promoveu o desenvolvimento de blastocistos.

O enfoque das pesquisas foram progressivamente evoluindo e o efeito da taurina e da superóxido dismutase em zigotos de coelha foi reforçado com a pesquisa de LI & FOOTE (1992), pois ambos antioxidantes promovem o rápido crescimento e desenvolvimento de blastocistos expandidos. No ano seguinte, o desenvolvimento embrionário mais rápido desde o estágio de zigoto, pela adição de catalase, taurina ou superóxido dismutase ao meio de cultivo livre de macromoléculas foi evidenciado em D3, pela contagem de células em mórulas e blastocistos de coelhas (LI *et al.*, 1993).

Em estudo ultra-estrutural de oócitos e embriões de búfalos foram detectados abundantes grânulos citoplasmáticos caracterizados por conteúdo lipídico elevado, proporcionando aspecto escuro sob a luz do estereomicroscópio (BONI *et al.*, 1992). Essas observações sugerem que

os oócitos e embriões desta espécie parecem ser mais sensíveis ao estresse oxidativo que os demais mamíferos (GASPARRINI *et al.*, 2000). Os embriões bovinos produzidos *in vitro* também possuem estes grânulos e são, possivelmente, os responsáveis pelos baixos índices de sobrevivência pós-descongelamento.

Estudos posteriores avaliaram as concentrações dos antioxidantes para a produção *in vitro* de embriões bovinos e determinaram que as concentrações de cisteamina entre 12,5 a 500 $\mu$ M proporcionam maior percentual de desenvolvimento embrionário (CAAMANO *et al.*, 1996; TAKAHASHI *et al.*, 2002); e embriões de melhor qualidade são obtidos com 100 a 150 $\mu$ M (TAKAHASHI *et al.*, 1996).

O estudo desenvolvido em búfalos por GASPARRINI *et al.* (2000) com 0, 50, 100 ou 200 $\mu$ M de cisteamina no meio de maturação (TCM-199+10%SFB + 0,5 $\mu$ g/mL de FSH + 5  $\mu$ g/mL de LH e 1  $\mu$ g/mL de 17- $\beta$  estradiol) resultou em significativa melhoria na qualidade I e II com 11, 19, 11 e 11%, e no desenvolvimento embrionário obtendo 14, 22, 15 e 13% de mórulas compactas/blastocistos, respectivamente.

Pesquisando o efeito da troca do meio de cultivo *in vitro* de embriões bovinos, IKEDA *et al.* (2000) sugerem que a redução no desenvolvimento embrionário nos sistemas de PIV pode estar associada ao acúmulo de metabólitos, como a amônia, ou altas concentrações de radicais livres no meio. Sob essas condições, formam-se as espécies reativas de oxigênio (ERO) que em bovinos promovem lesões no DNA (TAKAHASHI *et al.*, 2000). As espécies reativas de oxigênio podem aumentar a demanda de enzimas antioxidantes para manter o controle homeostático e comprometer o potencial de desenvolvimento subsequente. Os danos produzidos pelas espécies reativas de oxigênio em embriões bovinos podem ser evitados pela inclusão de vitamina E no meio de cultivo *in vitro*, que estimula o desenvolvimento antes e após a transferência do embrião para a receptora (OLSON & SEIDEL, 2000).

Não obstante, as pesquisas em busca de novos conhecimentos têm evoluído rapidamente. Há necessidade de identificar em que fase da produção *in vitro* os precursores da síntese de glutathione são mais eficientes para embriões bovinos produzidos *in vitro*.

### **3- Capítulo 1**

## **PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS COM CISTEAMINA**

**(*In vitro* production of bovine embryos with Cysteamine)**

SILVA D.S.<sup>1,2</sup>, RUBIN M.I.B.<sup>3</sup>, SILVA C.A.M.<sup>3</sup>, POZZOBON S.E.<sup>2</sup>, PEREIRA, L.P.<sup>4</sup>,  
NAVARRO, R.B.<sup>4</sup>, MAYER, A. R.<sup>5</sup>

<sup>1</sup> MV, Rua Benjamin Constant, 872/404. 97.050-020- Santa Maria/RS.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, UFSM/RS.

<sup>3</sup> DVM, Embryolab – Laboratório de Embriologia Animal, Departamento de Clínica de Grandes Animais, Centro de Ciências Rurais - Universidade Federal de Santa Maria 97.105-900 – Santa Maria/RS. Brasil. <sup>4</sup> Bolsista de Iniciação Científica, FATEC-UFSM/RS

<sup>5</sup> Estagiário, Universidade de Cruz Alta-Unicruz, Cruz Alta/RS. Brasil

#### **AGRADECIMENTOS**

À GENTEC BIOTECNOLOGIA ANIMAL pelo fornecimento do sêmen, ao LAMIC/UFSM, pelo constante apoio, à BIONORTE EMBRIÕES/RO, aos frigoríficos FRIBOI e CANDEIAS por disponibilizar material para esta pesquisa e à Capes pela bolsa de estudos.

Artigo submetido à Animal Reproduction.



## Produção *in vitro* de embriões bovinos com cisteamina

### RESUMO

As biotécnicas reprodutivas atuais utilizam como suporte para outros estudos a produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos, conduzida em três etapas igualmente importantes: maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV). Nesta pesquisa avaliou-se o efeito da cisteamina, um componente tiol, nos meios de maturação, fecundação ou de cultivo sobre o desenvolvimento embrionário. Complexos *cumulus*-oócitos (CCO=óócitos) coletados de ovários de vacas *Bos taurus indicus* provenientes de frigorífico foram selecionados e distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: Grupo Controle (sem cisteamina, n=488), Cisteamina na maturação (n=487), Cisteamina na fecundação (n=489) e Cisteamina no cultivo (n=493). Os oócitos dos quatro grupos foram maturados por 24h em TCM-199 modificado acrescido de 0,01UI/mL rFSHh + 0,05mg/mL de LH e 10% de SFB. No grupo cisteamina-maturação, o meio TCM-199 foi suplementado com 150µM de cisteamina. Os oócitos foram maturados a 38,5°C em estufa com 5%CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturada. A FIV (D0=dia da fecundação) foi realizada por 18-22 horas em meio Fert-Talp acrescido de heparina e PHE. Este meio utilizado no grupo cisteamina-fecundação foi adicionado de 150µM de cisteamina. Para capacitação, o sêmen foi descongelado e processado através do Gradiente de Percoll e a inseminação foi realizada com 2x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL, nas mesmas condições atmosféricas da MIV. Os prováveis zigotos de todos grupos experimentais foram cultivados em meio SOF suplementado com 5% SFB. No grupo cisteamina-cultivo o meio SOF foi acrescido de 150µM de cisteamina. A atmosfera gasosa nos 8 dias de cultivo foi de 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub> e umidade saturada. A clivagem foi de 86, 89, 88 e 90%, obtendo-se 29, 31, 38 e 35% de blastocistos em D7 e 21, 23, 27 e 29% de eclosão para os grupos controle, maturação, fecundação e cultivo, respectivamente. Em meio de fecundação (Fert-Talp) ou em meio de cultivo (SOFaaci) a cisteamina promove maior produção embrionária. O uso da cisteamina nos programas comerciais de OPU/PIV poderá contribuir para melhor eficiência da produção embrionária.

**Palavras-chave:** Antioxidantes, PIV, bovinos, cisteamina, *Bos taurus indicus*.

## ***In vitro* production of bovine embryos with cysteamine**

### **ABSTRACT**

Advanced reproductive techniques use the 3 phase of *in vitro* production for bovine embryos, i.e. *in vitro* maturation (IVM), *in vitro* fertilization (IVF) and *in vitro* culture (IVC) as support for a variety of studies. This study assessed the effect of cysteamine, a thiol component, on the embryonic development during maturation, fertilization and *in vitro* culture. *Bos taurus indicus* Cumulus-oocyte complexes (COC) obtained from cow ovaries collected at a slaughterhouse were randomly distributed in four groups: control-group (without cysteamine, n=488), cysteamine in maturation (n=487), cysteamine in fertilization (n=489) and cysteamine in the culture medium (n=493). All COC were matured for 24h in TCM-199+0,01IUrFSH/mL+0,05mgLH/mL+10% fetal calf serum (FCS). In the cysteamine-maturation group, the TCM-199 medium was supplemented with 150µM cysteamine. The COC were matured at 38.5°C with 5% of CO<sub>2</sub> in air and humid atmosphere. The IVF (D0=fertilization day) was performed for 18-22h in Talp-Fert medium with heparin and PHE under the same conditions as IVM. The medium of the cysteamine-fertilization group was supplemented with 150µM cysteamine. For sperm capacitation, the semen was thawed, selected by percoll gradient and insemination was done with 2x10<sup>6</sup> spermatozoa/mL. Presumed zygotes from all groups were cultured in SOF + 5% FCS. In the cysteamine culture group the SOF medium was supplemented with 150µM cysteamine. Culture was maintained at 5%CO<sub>2</sub>, 5%O<sub>2</sub>, 90%N<sub>2</sub> and saturated humidity for 8 days. Cleavage rates were 86, 89, 88 and 90 respectively, for control, maturation, fertilization and culture groups. Percentage of blastocyst on D7 were 29, 31, 38 e 35 and blastocyst hatched on D9 were 21, 23, 27 and 29, respectively. This study showed that adding cysteamine to the fertilization or culture medium improve the blastocyst production. Commercial OPU/IVP programs maybe benefit from the use of cysteamine.

**Key Words:** Antioxidants, IVP, bovine, cysteamine, *Bos taurus indicus*.

## Introdução

O termo ERO refere-se à forma de radicais livres derivados do oxigênio que podem levar à lesão oxidativa. Entre estas moléculas de vida curta estão o ânion superóxido ( $O_2^{0-}$ ), radical hidroxila ( $OH^0$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical peroxil ( $ROO^0-$ ). A geração de ERO ocorre fisiologicamente durante o metabolismo, sendo a respiração mitocondrial (fosforilação oxidativa) a maior fonte intracelular de ERO. O desenvolvimento embrionário dos mamíferos é negativamente afetado pelo aumento do estresse oxidativo que ocorre durante as condições de cultivo e as lesões resultantes das ERO que interferem significativamente na função celular (Halliwell and Gutteridge, 1989).

Outros mecanismos permitem a formação de ERO: a atividade de oxidação citosólica, superóxido dismutase, reações catalisadas pelos íons metálicos através da reação de Haber-Weiss ou da reação de Fenton. Como a produção de radicais livres é um processo contínuo *in vivo*, as células desenvolvem mecanismos de defesa chamados “sistema de defesa antioxidante” para neutralizar as espécies reativas de oxigênio e seus efeitos (Halliwell and Gutteridge, 1989). A maioria das células mamíferas possuem um eficiente sistema antioxidante, a catalase e a superóxido dismutase, como também os componentes “thiol” que atuam como tampões metabólicos que neutralizam as espécies reativas de oxigênio (Del Corso, 1994).

O estresse oxidativo resulta da diferença entre a produção de ERO e o sistema de defesa antioxidante, levando a danos celulares (peroxidação dos lipídeos das membranas, dos aminoácidos das proteínas e dos ácidos nucléicos). O estresse oxidativo pode induzir à morte celular por necrose ou apoptose dependendo do tipo celular, origem e velocidade da formação do estresse oxidativo (Halliwell et al., 1992).

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo tiol (L-Y glutamyl-L-cystinil-glicina), o maior componente sulfidrílico não-protéico das células de mamíferos que serve como reservatório de cisteína (Calvin et al., 1986; Lafleur et al., 1994). Possui importante função na fisiologia e metabolismo celular, mantendo a célula na forma de redução, protegendo-a contra os efeitos nocivos causados pelas lesões oxidativas. Além disso, tem efeito no transporte de aminoácidos, na síntese de DNA e protéica e na redução de disulfetos (Lafleur et al., 1994). Em 1986, Calvin e colaboradores relataram a participação da glutathiona no processo de descondensação do núcleo do espermatozóide do camundongo, em paralelo com a ativação do oócito. No cultivo embrionário, a glutathiona atua protegendo as células contra os radicais livres gerados pela degradação dos aminoácidos em amônio (Hamano et al., 1994; Lim et al., 1996).

Na década de 80, a síntese de glutathiona foi identificada no oócito da camundonga durante a maturação *in vitro* por Perreault et al. (1988). Posteriormente, também foi relatada em suínos (Yoshida et al., 1993), hamster (Miyamura et al., 1995), bovinos (De Matos et al., 1996), ovinos (De Matos et al., 2002) e, recentemente, em búfalos (Gasparini et al., 2006).

No início deste século, (De Matos and Furnus, 2000) evidenciaram na maturação *in vitro* em bovinos alta concentração de glutathiona intracelular após a indução de sua síntese com componentes tiol, tais como  $\beta$ -mercaptoetanol, cisteína e cistina; além disso, a mesma permanece durante a fecundação e ainda está presente no início do cultivo, implementando o índice de desenvolvimento. Atribuiu-se assim, que esta via metabólica é um importante componente no processo de maturação citoplasmática e que está envolvida com a fase subsequente da produção *in vitro* de embriões.

Já está estabelecido que componentes “thiol”, de baixo peso molecular, como a cisteamina e o  $\beta$ -mercaptoetanol, quando adicionados ao meio de maturação *in vitro* de bovinos são benéficos ao

desenvolvimento e à qualidade embrionária pelo aumento da síntese da glutatona. No entanto, nas outras etapas da produção *in vitro*, ainda não se dispõe de um mecanismo antioxidante eficiente que proteja as células contra o estresse oxidativo. Alguns antioxidantes, precursores da síntese de GSH, como a cisteamina, estão sendo utilizados na PIV de embriões em diversas espécies, tanto na pesquisa quanto comercialmente. Sabe-se da importância dos mesmos no que se refere à proteção celular, porém há controvérsias em relação à etapa do processo na qual podem ser utilizados e sua influência sobre a produção, qualidade embrionária e prenhez.

Assim, neste experimento avaliou-se o efeito da cisteamina nos meios de maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) ou no cultivo *in vitro* (CIV) sobre a produção e qualidade embrionária ao sétimo dia de cultivo e a taxa de eclosão em D9, com oócitos de vacas *Bos taurus indicus*.

## **Material e Método**

### Coleta dos ovários

Os ovários foram coletados de vacas *Bos taurus indicus* abatidas em frigorífico e transportados até o laboratório em solução fisiológica à temperatura inicial de 30°C num período de até 2 horas. Os folículos com diâmetro entre 2–8mm foram puncionados com auxílio de uma seringa e uma agulha 21G. Após a punção realizou-se a procura dos Complexos *cumulus*-oócitos (CCO) sob lupa estereomicroscópica, selecionando-se para a maturação CCO de qualidade I, II e III de acordo com os critérios adotados por De Loos (1989).

### Maturação *in vitro* dos oócitos

A maturação foi realizada com 25-50 Complexos *cumulus*-oócitos (CCO) em placas de Petri 10x35mm em gotas de 200 a 400 $\mu$ L de meio TCM-199 modificado, adicionado de 5,95mg/mL de HEPES, 0,025mg/mL de piruvato de sódio, 0,01UI de rFSHh/mL, 0,05mg/mL de LH, 10% de soro fetal bovino (SFB) por 24 horas, em estufa de cultivo a 38,5°C com 5% CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturada. A adição de 150 $\mu$ M de cisteamina na maturação foi realizada no grupo cisteamina-maturação. O grupo de oócitos-controle não recebeu cisteamina em nenhuma fase do processo de produção *in vitro*.

### Fecundação *in vitro*

Para a fecundação utilizou-se sêmen congelado de um touro *Bos taurus indicus* cuja palheta de 0,25mL foi descongelada por 10 segundos ao ar e por 20 segundos a 38,5°C. A seleção dos espermatozóides foi realizada através do Gradiente de Percoll em meio Talp-Sperm acrescido de 0,03mg/mL de BSA e 0,11mg/mL de piruvato de sódio. A dose inseminante foi de 2x10<sup>6</sup> espermatozóides/mL. A incubação dos oócitos/espermatozóides foi conduzida em gotas de 200-400 $\mu$ L de meio Talp-Fert com 0,03mg/mL de BSA, 0,022mg/mL de piruvato de sódio e 20 $\mu$ L de heparina, por 18 horas em estufa de cultivo a 38,5°C com 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturada. A adição de 150 $\mu$ M de cisteamina foi realizada no grupo cisteamina-fecundação.

### Cultivo *in vitro*

Após 18 horas do início da fecundação *in vitro*, os supostos zigotos foram submetidos ao desnudamento com auxílio de um pipetador e lavados 5 vezes em TCM-Hepes. O cultivo foi efetuado em gotas de 200-400 $\mu$ L em meio SOFaaci com 5% de SFB, 20 $\mu$ L/mL de aminoácidos essenciais, 10 $\mu$ L/mL de aminoácidos não-essenciais, distribuídas em

placas de Petri 10x35mm e sob óleo mineral, em estufa de cultivo celular com 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 95% de N<sub>2</sub>. A adição de 150µM de cisteamina ao meio de cultivo foi efetuada nos zigotos do grupo cisteamina-cultivo.

### **Avaliações**

A taxa de clivagem foi avaliada no dia 2 (D2) do cultivo, sendo considerado como dia zero (D0) o dia da fecundação. As taxas de produção embrionária e qualidade dos embriões foram avaliadas em D7 e a taxa de eclosão, em D9. A qualidade embrionária foi avaliada de acordo com os critérios recomendados pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS, 1998).

### **Análise Estatística**

Os dados foram processados pelo programa estatístico SAS (SAS, 1998) e os resultados foram submetidos ao teste X<sup>2</sup>. Para comparação das médias foi utilizado o nível de significância de 5%, totalizando 11 repetições.

### **Resultados**

Os resultados da clivagem, produção embrionária em D7 e de eclosão em D9 estão demonstrados na Figura 1. A taxa de clivagem entre os tratamentos maturação, fecundação, cultivo e o grupo de oócitos-controle foi similar. Houve diferença significativa (P<0,05) na produção de embriões e taxa de eclosão entre os tratamentos, sendo superiores quando a cisteamina foi incluída na etapa de fecundação ou de cultivo, em comparação ao grupo controle ou com cisteamina na maturação.

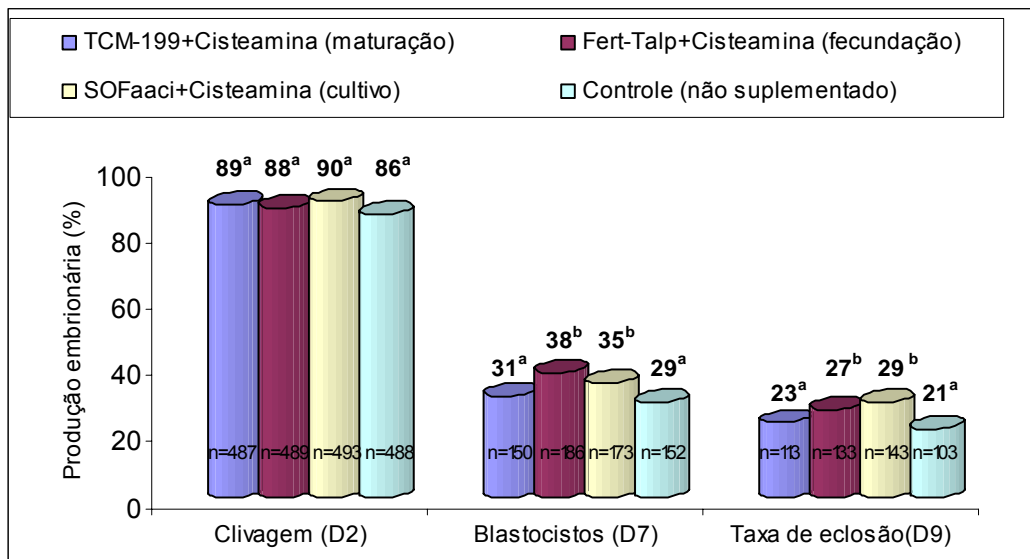


Figura 1 - Taxa de produção *in vitro* de embriões *Bos taurus indicus* em meios suplementados com 150µM de cisteamina na maturação, fecundação ou cultivo (P<0,05).

Na figura 2 está representado o total de embriões ao sétimo dia de cultivo, sendo que o maior número de embriões estava nos estádios de blastocisto e blastocisto expandido (Figura 2).

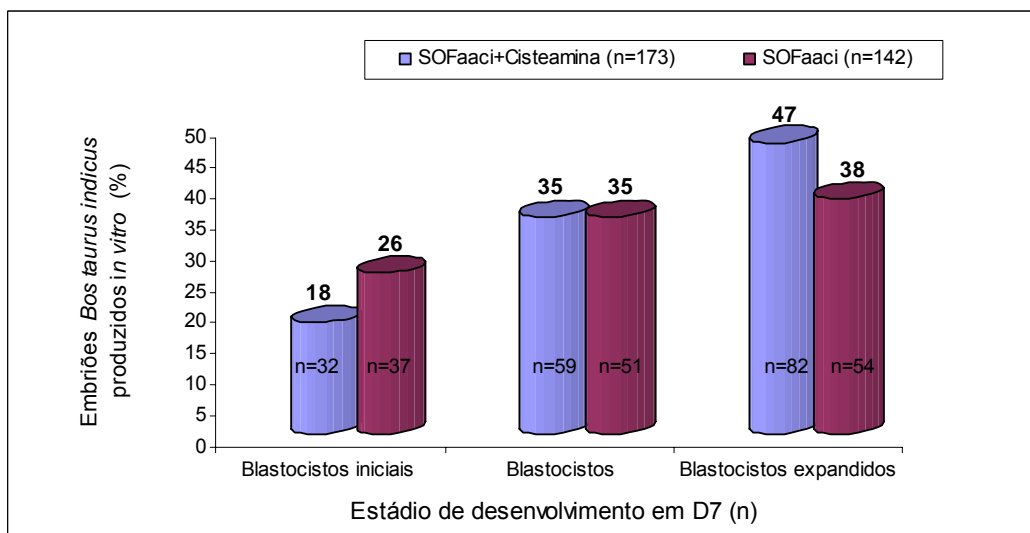


Figura 2 – Estádio de desenvolvimento embrionário ao sétimo dia de cultivo de embriões *Bos taurus indicus* produzidos *in vitro* em meio SOFaaci suplementado com 150µM de cisteamina e SOFaaci sem cisteamina (controle).



Na figura 3 estão representados os embriões avaliados em D7 nos estádios de blastocisto inicial, blastocisto ou blastocisto expandido classificados quanto à qualidade, nas categorias I e II (IETS, 1998). Na presente pesquisa, não houve diferença ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos e grupo controle.

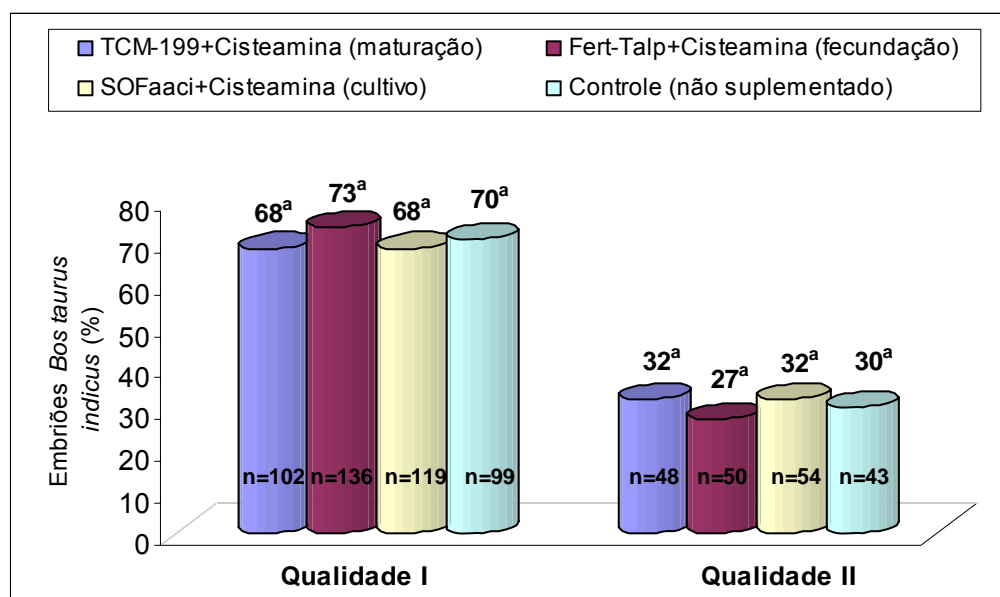


Figura 3 – Qualidade ao sétimo dia de cultivo de embriões *Bos taurus indicus*, produzidos *in vitro* em meio suplementado ou não com 150 $\mu$ M de cisteamina ( $P>0,05$ ).

## Discussão

Novos conhecimentos sobre o metabolismo embrionário e condições de cultivo são pontos críticos para promover com eficiência da produção *in vitro* em bovinos, uma vez que no Brasil a média de blastocistos ainda é inferior a 50%.

Nesta pesquisa, a taxa de clivagem variou de 86 a 90% e foi similar entre os tratamentos e o grupo de oócitos/embriões controle, cuja unidade experimental não recebeu cisteamina em qualquer fase da produção *in vitro*. Percentual similar (89 a 93%) foi relatado no estudo de Lonergan et al. (1999) com meio SOF, SOF+taurina, SOF+BSA+taurina ou

SOF+SFB+taurina no cultivo de zigotos bovinos produzidos *in vitro* sob atmosfera de 5% de O<sub>2</sub>. Quando sob atmosfera de 20% de O<sub>2</sub>, a clivagem naqueles tratamentos também foi similar e variou de 93 a 96%. Índices inferiores de clivagem (69% a 82%) foram obtidos por Ali et al. (2003) ao avaliar o efeito da cisteína (0,1 e 0,6 mM), N-acetil-cisteína (0,1mM e 0,6mM) catalase (5UI e 127UI) e superóxido dismutase (10 e 100 UI/mL). A explicação está no fato de que altas concentrações de cisteína, NAC ou catalase durante o período da FIV reduzem significativamente a taxa de clivagem e subsequente desenvolvimento embrionário já que alguns níveis de ERO são necessários para a fecundação *in vitro* (Ali et al., 2003).

Em bovinos, o estudo de Luvoni et al. (1996) evidenciou que 3 UI/mL de superóxido dismutase (SOD) e 1,0mM de glutatona (GSH) diminuem a taxa de penetração dos espermatozoides nos oócitos bovinos durante a FIV. Porém, quando a GSH foi adicionada ao cultivo, a produção embrionária foi superior (35%) à do grupo de embriões-controle (19%). Reforçando estas afirmações, Blondin et al. (1997) detectaram na FIV que a adição de superóxido dismutase (1, 10 ou 100UI/mL) não teve efeito nas taxas de penetração, sugerindo que as espécies reativas de oxigênio devem ser benéficas para os gametas sob condições específicas. Na presente pesquisa, a cisteamina foi adicionada ao meio de maturação com 10% de soro fetal bovino e a taxa de clivagem, produção embrionária e de eclosão foi similar ao controle. Supõe-se, pelo fato dos oócitos permanecerem durante a maturação na condição de baixo metabolismo (Rieger et al., 1992) e das células do *Cumulus oophorus* sintetizarem GSH (De Matos et al., 1997), que o período de 24 horas pode não ter sido suficientemente longo para comprometer o desenvolvimento subsequente. Há ainda a hipótese de que, o meio com suplementação protéica possa inibir a ação dos antioxidantes (Li et al., 1993), contrariamente ao verificado em zigotos de coelhas que evoluíram rapidamente até blastocisto expandido no cultivo com antioxidante e sem proteínas.

Quando vacas *Bos taurus indicus* do sudeste brasileiro serviram como material para a pesquisa de Gonçalves et al. (2005), o maior percentual de clivagem foi obtido com o uso de cisteamina na fecundação em comparação ao  $\beta$ -mercaptoetanol, sugerindo que este último não é adequado para a fecundação *in vitro*.

A taxa de blastocistos em D7 e de eclosão em D9 foram superiores quando se utilizou cisteamina na fecundação ou no cultivo (Figura 1). Estes resultados corroboram o estudo de Takahashi et al. (1993) que com diferentes concentrações de cisteamina em TCM-199+10% de SFB no cultivo *in vitro* sem células somáticas, observaram aumento significativo (29% com 50 $\mu$ M de cisteamina) no desenvolvimento de embriões de 6 a 8-células até o estágio de blastocisto, e nos níveis intra-celulares de glutathione (53 pM/20 embriões/10 $\mu$ L). Contrariamente, níveis inferiores (7,1%) de produção embrionária e intracelulares de glutathione (4,2pM de glutathione/20embriões/10 $\mu$ L) foram obtidos em TCM-199+10% SFB, sem suplementação de cisteamina.

Rosenkrans et al. (1993) obtiveram melhor desenvolvimento embrionário em D7 (22% vs 32%) em meio CR1 com aminoácidos (CR1aa), reduzindo a concentração de O<sub>2</sub> de 20% para 5%. Lee et al., (1999) suplementaram o SOF com  $\beta$ -mercaptoetanol e a produção de blastocistos elevou-se de 18,5% para 26,6%. Em 2002, Fischer-Brown e colaboradores cultivaram embriões bovinos em SOFaa+ $\beta$ -mercaptoetanol elevando a taxa de blastocistos em D7 de 27% para 32% e de eclosão de 52 para 79% (P<0,05) na presença de 10% de soro, ficando por elucidar o que determinou a interação soro +  $\beta$ -mercaptoetanol. Na presente pesquisa, utilizou-se 5% de SFB em meio SOF suplementado com aminoácidos, citrato, inositol e cisteamina, obtendo-se 35% de embriões em D7, provavelmente pela superioridade de nutrientes, associada à ação antioxidante da cisteamina. A taxa de eclosão foi inferior à relatada na

literatura, no entanto a porcentagem de embriões eclodidos foi calculada sobre o total de oócitos maturados.

O maior percentual de desenvolvimento embrionário no grupo de embriões tratados com cisteamina no cultivo da presente pesquisa, comparado com a maturação e controle, pode ser fundamentado na pesquisa de Umaoka et al. (1992) que demonstraram o efeito negativo do oxigênio ao cultivar zigotos de camundongas com ou sem superóxido dismutase (SD), expostos por uma hora a 20% de oxigênio ambiental. Ao efetuar os procedimentos de manipulação, os oócitos (maturação) e zigotos (desnudamento e avaliação da clivagem) são submetidos ao oxigênio ambiental (20%) pelo período de 20 a 60 minutos, na dependência do número de oócitos ou zigotos. Adicionalmente, nesse período os embriões são expostos à luz visível que também afeta o desenvolvimento embrionário por produzir radicais livres (Goto et al., 1993; Nakayama et al., 1994).

Gordon (1993) enfatiza que os embriões bovinos produzidos *in vitro* apresentam desenvolvimento acelerado tornando-se altamente susceptíveis ao estresse oxidativo. Isto sugere que a cisteamina neutralizou as espécies reativas de oxigênio geradas pelo elevado metabolismo dos embriões em adiantado desenvolvimento, uma vez que 20% dos embriões em D7 eram blastocistos iniciais e os demais blastocistos ou blastocistos expandidos (Figura 2).

A qualidade dos embriões (Figura 3) produzidos *in vitro* usualmente não é relatada na literatura. Uma vez alcançado o estágio de blastocisto, os mesmos são destinados à transferência para receptoras. Neste estudo, a ausência de diferença na qualidade morfológica dos embriões entre os tratamentos e o grupo controle, indica que a cisteamina influencia somente os índices de produção embrionária.

## Conclusões

A cisteamina aumenta a produção *in vitro* de blastocistos *Bos taurus indicus* quando adicionada ao meio de fecundação ou de cultivo.

A qualidade embrionária não é influenciada pela adição da cisteamina em qualquer etapa (maturação, fecundação ou cultivo) da produção *in vitro* de embriões *Bos taurus indicus*.

## Referências

**ALI AA, BILODEAU JF, SIRARD MA.** 2003. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. *Theriogenology*, 59(3-4):939-949.

**BLONDIN P, COENEN K, SIRARD MA.** 1997. The impact of reactive species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. *Journal of Andrology*, 18(4):454-460.

**CALVIN HI, GROSSHANS K, BLAKE EJ.** 1986. Estimation and manipulation of glutathione levels in prepuberal mouse ovaries and ova: relevance to sperm nucleus transformation in the fertilized egg. *Gamete Research*, 14(3):265-267.

**DEL CORSO A, CAPIELLO M, MURA U.** 1994. Thiol-dependent oxidation of enzymes: the last change against oxidative stress. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 26(6):745-750.

**DE MATOS DG, FURNUS CC.** 2000. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine *in vitro* maturation on embryo development: effect of  $\beta$ -mercaptoethanol, cysteine. *Theriogenology*, 53(3):761-771.

**DE MATOS DG, FURNUS CC, MOSES DF, MARTINEZ AG, MATKOVIC M.** 1996. Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Molecular Reproduction Development*, 45(4):451-457.

**DE MATOS DG, CECILIA C, MOSES DF.** 1997. Glutathione synthesis during *in vitro* of bovine oocytes: Role of cumulus cells. *Biology of Reproduction*, 57(4):1420-1425.

**DE MATOS DG, GASPARRINI B, PASQUALINI SR, THOMPSON JG.** 2002. Effect of glutathione synthesis stimulation during *in vitro* maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology*, 57(5):1443-1451.

**FISCHER-BROWN AE, MONSON RL, FREDRICKSON JR, RUTLEDGE JJ.** 2002. Antioxidant use with FCS and BSA supplementation in SOF medium: effect on development and cell number. *Theriogenology*, 57(1):518.

**GASPARINI B, BOCCIA L, MARCHANDISE J, DI PALO R, GEORGE F.** 2006. Enrichment of *in vitro* maturation medium for buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes with thiol compounds: Effects of cystine on glutathione synthesis and embryo development. *Theriogenology*, 65(1):275-287.

**GONÇALVES FS, BARRETO LSS, ARRUDA RP, MINGOTI GZ.** 2005. Efeito dos antioxidantes durante a fecundação *in vitro* sobre a qualidade e fertilidade de espermatozoides bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae Suppl*, 33:355.

**GORDON I.** 1993. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. Cambridge: University Press, 600p.

**GOTO Y, NODA Y, NAKANO M.** 1993. Increased generation of reactive oxygen species in embryo cultured *in vitro*. *Free Radical Biology and Medicine*, 15(1):69-75.

**HALLIWEL B, GUTTERIDGE JMC,** 1989. The chemistry of oxygen radicals and other derived species. In: HALLIWEL B, GUTTERIDGE JMC. (Eds). *Free Radical in Biology and Medicine*. 2<sup>nd</sup>. Oxford: Oxford University Press. pp.22-85.

**HALLIWEL B, GUTTERIDGE JMC, CROSS CE.** 1992. Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? *Journal of Laboratory Clinical Medicine*, 119(6):598-620.

**HAMANO S, KUWAYAMA M, TAKASHASHI M, OKAMURA N, OKANO A, NAGAI T.** 1994. Effect of  $\beta$ -mercaptoethanol on the preimplantation development of bovine embryos fertilized *in vitro*. *Journal of Reproduction and Development*, 40:355-359.

**IETS.** 1998. Certification and identification of the embryo. In: STRINGFELLOW DA, SEIDEL SM. (Eds.). *Manual of the International Embryo Transfer Society*. Savoy, IL, USA: IETS. pp.103-116.

**LAFLEUR MVM, HOORWEG JJ, JOENJE H, WESRMIJE EJ, RETEL J.** 1994. The ambivalent role of glutathione in the protection of DNA against singlet oxygen. *Free Radical Research*, 21(1):9-17.

**LEE CP, ELHASSAN YM, WESTHUSIN ME.** 1999. The effect of  $\beta$ -mercaptoetanol and n-acetyl cysteine on development of bovine blastocysts produced *in vitro*. *Biology of Reproduction*, 60(1):193.

**LI J, FOOTE RH, SIMKIN M.** 1993. Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase, taurine or superoxide dismutase. *Biology of Reproduction*, 48(1):33-37.

**LIM JM, LIU SS, HANSEL W.** 1996. Intracytoplasmic glutathione concentration and the role of  $\beta$ -mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryos. *Theriogenology*, 46(3):429-440.

**LONERGAN P, O'KEARNEY-FLYNN M, BOLAND MP.** 1999. Effect of protein supplementation and presence of antioxidant on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medium under high and low oxygen tension. *Theriogenology*, 51(8):1565-1576.

**LUVONI GC, KESKINTEPE L, BRACKETT BG.** 1996. Improvement in bovine embryo production *in vitro* by glutathione-containing culture media. *Molecular Reproduction Development*, 43(4):437-443.

**MIYAMURA M, YOSHIDA M, HAMANO S, KUWAYAMA M.** 1995. Glutathione concentration during maturation and fertilization in bovine oocytes. *Theriogenology*, 43(1):282.

**NAKAYAMA T, NODA Y, GOTO Y, MORI T.** 1994. Effect of visible light and other environmental factors on the production of oxygen radicals by hamster embryos. *Theriogenology*, 41(2):499-510.

**PERREAULT SD, BARBEE RR, SLOTT VI.** 1988. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Development Biology*, 125(1):181-186.



**RIEGER D, LOSKUTOFF NM, BETTERIDGE KJ.** 1992. Developmentally related changes in the metabolism of glucose and glutamine by cattle embryos produced and co-cultured *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 95(2):585-595.

**ROSENKRANS CF, ZENG GQ, MCNAMARA GT, SCHOFF PK.** 1993. Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates. *Biology of Reproduction*, 49(2):459-462.

**SAS** user's guide: Statistical Analysis System.1998. Release 6.12. SAS Institut, Cary, NC, USA.

**TAKAHASHI M, NAGAI T, HAMANO S, KUWAYAMA M, OKAMURA N, OKANO A.** 1993. Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos. *Biology of Reproduction*, 49(2):228-232.

**UMAOKA Y, NODA Y, NARIMOTO K, MORI T.** 1992. Developmental potentiality of embryos cultured under low oxygen tension with superoxide dismutase. *Journal of in vitro Fertilization and Embryo Transfer*, 8(5):245-249.

**YOSHIDA M, ISHIGAKI K, NAGAI T, CHIKYU M, PURSEL VG.** 1993. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biology of Reproduction*, 49(1):89-94.

#### **4. CONCLUSÕES**

A cisteamina aumenta a produção *in vitro* de blastocistos *Bos taurus indicus* quando adicionada ao meio de fecundação ou de cultivo.

A qualidade embrionária não é influenciada pela adição da cisteamina em qualquer etapa (maturação, fecundação ou cultivo) da produção *in vitro* de embriões *Bos taurus indicus*.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, A., GUPTA, S., SHARMA, R.K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproduction of Biology Endocrinology**, v.28, p.1-20, 2005.

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.939-949, 2003.

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

BONI, R., et al. Ovum pick-up and embryo production *in vitro*: an established procedure. In: Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association, 8<sup>th</sup>., 1992, Lyon. **Proceedings...**Lyon: European Embryo Transfer Association, 1992. p.130.

CAAMANO, J.N., et al.  $\beta$ -Mercaptoetanol enhances blastocyst formation rate of bovine *in vitro* matured/*in vitro* fertilized embryos. **Biology of Reproduction**, v.55, n.5, p. 1179-1184, 1996.

CAAMANO, J.N., RYOO, Z.Y., YOUNGS, C.R. Promotion of development of bovine embryos produced *in vitro* by addition of cystine and  $\beta$ -mercaptoethanol to a chemically defined medium. **Journal Dairy Science**, v.81, n.2, p.369-374, 1998.

CALVIN, H.I., GROSSHANS, K., BLAKE, E.J. Estimation and manipulation of glutathione levels in prepuberal mouse ovaries and ova: relevance to sperm nucleus transformation in the fertilized egg. **Gamete Research**, v.14, n.3, p.265-267, 1986.

DEL CORSO, A., CAPIELLO, M., MURA, U. Thiol-dependent oxidation of enzymes: the last change against oxidative stress. **International Journal Biochemical**, v.26, n.6, p.745-750,1994.

FEUGANG, JM., et al. Effect of prooxidant agents added at the morula/blastocyst stage on bpvine embryo development, cell death and glutathione content. **Zygote**, n.11, p.107-118, 2003.

FISCHER-BROWN, A.E., et al. Antioxidant use with FCS and BSA supplementation in SOF medium: effect on development and cell number. **Theriogenology**, v.57, n.1, p.518, 2002.

GASPARRINI, B., et al. Effect of cysteamine during *in vitro* maturation on buffalo embryo development. **Theriogenology**, v.54, n.9, p.1537-1542, 2000.

GASPARINI, B., et al. Enrichment of *in vitro* maturation medium for buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes with thiol compounds: Effects of cystine on glutathione synthesis and embryo development. **Theriogenology**, v.65, n.2, p.275-287, 2006.

GONÇALVES, F.S., et al. Efeito dos antioxidantes durante a fecundação *in vitro* sobre a qualidade e fertilidade de espermatozóides bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, n.33 (suplemento 1) p.355, 2005.

GORDON, I. **Laboratory Production of Cattle Embryos**. Cambridge: University Press, 1993. 600p.

GORDON, I. **Laboratory Production of Cattle Embryos**. 2 ed. Cambridge: University Press, 2003. 548p.

GOTO, Y., et al. Increased generation of reactive oxygen species in embryo cultured *in vitro*. **Free Radical Biological Medicine**, v.15, n.1, p.69-75,1993.

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

GUYADER-JOLY, C., GUÉRIN, P., RENARD, J. P. Precursors of taurine in female genital tract of mammals: effect on gametes and embryo. **Amino Acids**, v.15, p.27-42, 1998.

HALLIWEL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. The chemistry of oxygen radicals and other derived species. HALLIWEL, B., GUTTERIDGE, J.M.C In: **Free Radical in Biology and Medicine**. 2 ed. Oxford: Oxford University Press. 1989. p.22-85.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C., CROSS, C.E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? **Journal Laboratory Clinical Medicine**, n.119, v.6, p. 598-620, 1992.

HAMANO, S., et al. Effect of  $\beta$ -mercaptoethanol on the preimplantation development of bovine embryos fertilized *in vitro*. **Journal of Reproduction and Development**, v.40, p.355-359, 1994.

IETS. 1998. Certification and identification of the embryo. In: STRINGFELLOW DA, SEIDEL SM. (Eds.). **Manual of the International Embryo Transfer Society**. Savoy, IL, USA: IETS. pp.103-116.

IKEDA, K., TAKASHI, Y., KATAGIRI, S. Effect of medium change on the development of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes cultured in medium containing amino acids. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.62, n.1, p.121-123, 2000.

ISHII, T., BANNAI, S., SUGITA, Y. Mechanism of growth stimulation of L1210 cells by 2-mercaptoethanol *in vitro*. **Journal of Biological Chemistry**, v.256, n.23, p.12387-12393, 1981.

LAFLEUR, M.V.M., et al. The ambivalent role of glutathione in the protection of DNA against singlet oxygen. **Free Radical Research**, v.21, n.1, p.9-17, 1994.

LEE, C.P., ELHASSAN, Y.M., WESTHUSIN, M.E. The effect of  $\beta$ -mercaptoethanol and n-acetyl cysteine on development of bovine blastocysts produced *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.60, n.1, p.193, 1999.

LEGGE, M., SELLENS, M.H. Free radical scavengers ameliorate the 2-cell block in mouse embryo culture. **Human Reproduction**, v.6, n.6, p.867-871, 1991.

LEQUARRE, A.S., et al. Expression of Cu-Zn and Mn superoxide dismutase in bovine oocyte and during preimplantation embryonic development. In: Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association, 15<sup>th</sup>, 1999, Lyon. Proceedings...Lyon: European Embryo Transfer Association, 1999. p.186.

LI, J., FOOTE, R.H. Effect of taurine and superoxide dismutase upon cultured rabbit zygotes. **Biology of Reproduction**, v.46, n.1, p.121, 1992.

LI, J., FOOTE, R.H., SIMKIN, M. Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase, taurine or superoxide dismutase. **Biological of Reproduction**, v.48, n.1, p.33-37, 1993.

LIM, J.M., LIOU, S.S., HANSEL, W. Intracitoplasmatic glutathione concentration and the role of  $\beta$ -mercaptoetanol in preimplantation development of bovine embryos. **Theriogenology**, v.46, n.3, p.407-16, 1996.

LONERGAN, P., O'KEARNEY-FLYNN, M., BOLAND, M.P. Effect of protein supplementation and presence of an antioxidant on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medium under high and low oxygen tension. **Theriogenology**, v.51, n.8, p.1565-1576, 1999.

LUVONI, G.C., KESKINTEPE, L., BRACKETT, B.G. Improvement in bovine embryo production *in vitro* by glutathione-containing culture media. **Molecular Reproduction Development**, v.43, n.4, p.437-443, 1994.

MATOS, D.G. de., et al. Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. **Molecular Reproduction and Development**, v.45, n.4, 451-457, 1996.

MATOS, D.G. de., CECILIA, C., MOSES, D.F. Glutathione syntesis during *in vitro* of bovine oocytes: Role of cumulus cells. **Biology of Reproduction**, v.57, n.4, p.1420-1425, 1997.

MATOS, D.G. de., 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 embryos. **Theriogenology**, v.54, n.5, p.761-771, 2000.

MATOS, D.G. de., et al. Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation and embryo culture: a useful tool for increasing the efficiency of bovine *in vitro* production. **Molecular Reproduction and Development**, v.62, n.2, p.203-209, 2002

MATOS, D.G. de., et al. Effect of glutathione synthesis stimulation during *in vitro* maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. **Theriogenology**, v.57, n.5, p.1443-1451, 2002.

MIYAMURA, M., et al. Glutathione concentration during maturation and fertilization in bovine oocytes. **Theriogenology**, v.43, n.1, p.282, 1995.

NAGAO, Y., et al. Effects of oxygen concentration and oviductal epithelial tissue on the development of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes cultured in protein-free medium. **Theriogenology**, v.41, n.3, p.681-687, 1994.

NAKAYAMA, T., et al. Effect of visible light and other environmental factors on the production of oxygen radicals by hamster embryos. **Theriogenology**, v.41, n.2, p.499-510, 1994.

OLSON, S.E., SEIDEL, G.E. Culture of *in vitro*-produced bovine embryos with vitamin E improves development *in vitro* and after transfer to recipients. **Biology of Reproduction**, v.62, n.2, p.248-252, 2000.



PABON, J.E., FINDLEY, W.F., 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, 1989.

PERREAULT, S.D., BARBEE, R.R., SLOTT, V.I. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. **Development Biology**, n.125, v.1, p.181-186, 1988.

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.205-212, 1991.

RIEGER, D., LOSKUTOFF, N.M., BETTERIDGE, K.J. Developmentally related changes in the metabolism of glucose and glutamine by cattle embryos produced and co-cultured *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.95, n.2, p.585-595, 1992.

ROSENKRANS, C.F., et al. Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates. **Biology of Reproduction**, v.49, n.2, p.459-462, 1993.

SAS INSTITUTE (Cary NC). **SAS user's guide**: Statistical Analysis System, Release 6.12-1998.

TAKAHASHI, M., et al. Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v.49, n.2, p.228-232, 1993.

TAKASHASHI, H., et al. Effect of  $\beta$ -mercaptoethanol on the viability of IVM/IVF/IVC bovine embryos during long-distance transportation in plastic straws. **Theriogenology**, v.46, n.6, p.1009-1015, 1996.

TAKAHASHI, M., et al. Effect of oxidative stress on development and DNA damage in *in vitro* cultured bovine embryos by COMET assay. **Theriogenology**, v.53, n.3, p.365, 2000.

TAKAHASHI, M., et al. Promoting effect of beta-mercaptoethanol on *in vitro* development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v.63, n.3, p.562-567, 2002.

TAKEUCHI, K., et al. The effect of oxygen on the development of the early mouse embryo *in vitro*. **Japanese Journal of Fertility and Sterility**, v.34, n.1, p.26-28, 1989.

TAYLOR, C.T., et al. Effect of antioxidants on human preimplantation embryo development *in vitro*. **Human Reproduction**, v.7, n.1, p.173, 1992.

TELFORT, N.A., WATSON, A.J., SCHULTZ, G.A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. **Molecular Reproduction and Development**, v.26, n.1, p. 90-100, 1990.

UMAOKA, Y., et al. Developmental potentiality of embryos cultured under low oxygen tension with superoxide dismutase. **Journal of *in vitro* Fertilization and Embryo Transfer**, v.8, n.5, p.245-249, 1992.

YOSHIDA, M., et al. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. **Biology of Reproduction**, v.49, n.1, p.89-94, 1993.