



ARTIGO

REVISÃO DE LITERATURA
PRODUÇÃO E
REPRODUÇÃO ANIMAL

REVISTA
INVESTIGAÇÃO
medicina veterinária

ESTRESSE OXIDATIVO NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS: REVISÃO DE LITERATURA

Oxidative stress on in vitro production of bovine embryos: a review

M.V. Mônica C. Trindade¹, MSc. Beatrice I. Macente², Prof. Dr. Wilter R. R. Vicente³, Profa. Dra. Maricy Apparício^{4*}

¹Médica Veterinária Autônoma

²Doutoranda do Programa de Reprodução Animal – FCAV – Unesp, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Jaboticabal, SP

³Professor titular de Obstetrícia Veterinária – FCAV – Unesp, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Jaboticabal, SP

⁴Professora do Programa de Mestrado em Ciência Animal – UNIFRAN – Departamento de Reprodução Animal, - Franca, SP

RESUMO

O estresse oxidativo influencia a eficiência da produção *in vitro* de embriões. Resultados desse estresse podem causar alterações negativas nos processos de maturação e fecundação dos oócitos bem como de cultivo dos prováveis embriões. Para reverter o quadro de estresse oxidativo, é preciso reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou aumentar a quantidade de antioxidantes disponíveis. A presente revisão de literatura visa apresentar a influência do estresse oxidativo na reprodução animal bem como estratégias que possam ser realizadas para impedir o seu acontecimento e obter melhores índices de desenvolvimento, tais como o uso de antioxidantes no meio de maturação de oócitos e do cultivo de embriões bovinos.

Palavras-chave: oxidativo, EROs, produção de embriões bovinos, antioxidantes.

ABSTRACT

Oxidative stress influences the efficiency of *in vitro* embryo production. Results of this stress can cause negative changes in the processes of oocyte maturation and fertilization as well as in the culture of embryos. To reverse the oxidative stress, we need to reduce reactive oxygen species (ROS) production or increase the amount of antioxidants available. The present review aims to present the influence of oxidative stress in animal reproduction as well as strategies that can prevent its occurrence and improve developmental rates, including the use antioxidants in oocyte maturation and embryo culture media.

Keywords: stress, ROS, production of bovine embryos, antioxidants.

INTRODUÇÃO

Robert Edwards foi um dos pioneiros na produção *in vitro* de embriões (PIVE), tendo sido corresponsável pela primeira descrição do “bebê de proveta”, importante marco nas ciências reprodutivas e na história da evolução tecnológica da humanidade (ZHAO et al., 2011).

A partir de então a PIVE expandiu-se para outras espécies animais e, em 1982, nasceu nos Estados Unidos o primeiro bezerro produzido por fertilização *in vitro* (FIV) (VARAGO et al., 2008). A PIVE compreende algumas etapas básicas como: a recuperação de óocitos por meio de aspiração de folículos antrais, seguida da maturação oocitária *in vitro* (MIV); a fertilização dos óocitos *in vitro* (FIV) e o cultivo embrionário *in vitro* (CIV) até os estádios de mórula e blastocisto (GARCIA et al., 2005), quando são transferidos para receptoras ou criopreservados (VARAGO et al., 2008).

Na etapa da MIV, deve ocorrer uma completa maturação oocitária para que o óocito esteja competente, ou seja, apto a ser fecundado. A maturação decorre de mudanças, que devem ocorrer de forma simultânea e ordenada no núcleo e no citoplasma.

Durante a FIV, os óocitos devem estar competentes (maturados) e os espermatozoides capacitados para que ocorra a união entre os gametas e a formação do zigoto (MACHATY et al., 2012). Por fim, no CIV devem ocorrer as divisões mitóticas das células zigóticas e a completa formação do embrião até a fase de blastocisto (GORDON, 2003).

No Brasil, essa biotecnologia foi rapidamente incorporada ao setor produtivo, de tal forma que nos últimos anos o país foi responsável por cerca de 50% da produção de embriões bovinos *in vitro* do mundo (VIANA e CAMARGO, 2007).

A PIVE de embriões bovinos tem como objetivo principal aprimorar a eficiência reprodutiva (redução do intervalo entre partos e aumento de bezerros por fêmea ao ano) de animais geneticamente superiores e amplia-se para aqueles com potencial genético, mas com infertilidade adquirida ou que não respondem aos protocolos de super ovulação (GARCIA et al., 2005).

É importante salientar que a viabilidade econômica da técnica não está relacionada apenas à taxa de produção dos embriões, mas principalmente com a qualidade do embrião, a capacidade de estabelecer a gestação e o desenvolvimento fetal e placentário normais, além da obtenção de gestações a termo e nascimento de crias viáveis e saudáveis (HANSEN et al., 2010).

Sabe-se que os embriões são extremamente vulneráveis a todas as mudanças que ocorrem nos fatores ligados ao meio em que são expostos, o que pode comprometer a eficiência dessa biotécnica (NIEMANN e WRENZYCKI, 2000; DURANTHON et al., 2008). Vários fatores influenciam a PIVE: qualidade do óocito, presença ou não de co-cultivo, quantidade de embriões cultivados por volume de meio, composição do meio e atmosfera gasosa (KHURAMA; NIEMANN, 2000).

Sabe-se que o estresse oxidativo influencia a eficiência da PIVE. Consequências desse estresse podem causar alterações negativas nos processos de maturação e fecundação dos óocitos bem como de cultivo dos prováveis embriões. Para reverter este quadro, é preciso reduzir a produção de ROS ou aumentar a quantidade de antioxidantes disponíveis. Deste modo, diversos estudos têm sido desenvolvidos (ANDRADE et al., 2010).

A presente revisão de literatura visa apresentar a influência do estresse oxidativo na reprodução animal bem como estratégias que possam ser utilizadas para impedir o seu

acontecimento, dentre elas, a suplementação com compostos antioxidantes no meio de maturação de óocitos e/ou do cultivo de embriões bovinos.

CONDIÇÕES DE CULTIVO EMBRIONÁRIO

As condições de cultivo embrionário durante a PIVE são extremamente importantes para garantir a viabilidade embrionária e o sucesso dessa biotécnica. Os fatores ambientais, que envolvem o embrião durante o período pré-implantacional, são imprescindíveis para o correto desenvolvimento embrionário.

Acredita-se que para se obter bons resultados em um sistema de PIVE, as condições em que gametas e embriões são expostos devem se aproximar às condições fisiológicas observadas durante o desenvolvimento embrionário *in vivo* (KHURAMA e NIEMANN, 2000; HANSEN et al., 2010). Portanto, é preciso o conhecimento básico das condições ambientais durante o desenvolvimento dos embriões *in vivo*, (SANGILD et al., 2000; BESENFELDER et al., 2012), que são altamente complexas e dinâmicas (HARVEY et al., 2007), para que possam ser mimetizadas em laboratório.

Sabe-se que embriões são extremamente vulneráveis a todas as mudanças que ocorrem nos fatores ligados ao meio em que são expostos (NIEMANN e WRENZYCKI, 2000; DURANTHON et al., 2008). Vários fatores influenciam a PIVE, tais como a qualidade do óocito, a composição do meio, a presença ou não de co-cultivo, a quantidade de embriões cultivados por volume de meio e a atmosfera gasosa (KHURAMA e NIEMANN, 2000). Dentre esses fatores, a composição do meio e atmosfera gasosa têm sido bastante estudadas visando à obtenção de condições ideais, que favoreçam o desenvolvimento embrionário. Embriões

produzidos *in vitro* são mais susceptíveis aos efeitos do estresse oxidativo, pois seus mecanismos de defesas não são suficientes para proteger sua estrutura celular delicada (AITKEN et al., 1993).

Algumas diferenças observadas nos embriões produzidos *in vitro* são: menor quantidade de células, alterações cromossômicas, baixa criotolerância, maior quantidade de lipídeos, características que podem influenciar a sobrevivência embrionária pós-transferência e conseqüentemente, o estabelecimento da prenhez (RIZOS et al., 2002b; HANSEN et al., 2010).

Os sistemas de cultivo *in vitro* podem ter um impacto, não apenas no potencial de desenvolvimento e qualidade dos embriões produzidos, mas também no perfil de expressão de genes, o que sugere que as alterações na composição do meio de cultivo são capazes de modular a expressão global dos genes (FELMER et al., 2011).

Dessa forma, o aprimoramento das condições de cultivo, através da identificação dos fatores que estão envolvidos na maturação de oócitos, fertilização *in vitro* e desenvolvimento embrionário, bem como compreender os fatores moleculares, é essencial para aproximar a eficiência dessa técnica aos embriões produzidos *in vivo*.

Meios de cultivo

Dentre as condições de cultivo envolvidas na produção de embriões, os meios utilizados na PIVE são muito estudados já que podem perturbar o desenvolvimento e a morfologia embrionária e alterar a expressão de genes importantes relacionados ao metabolismo e desenvolvimento embrionários (RIZOS et al., 2003; FEUGANG et al., 2009; FELMER et al., 2011).

Os meios de cultivo utilizados para a PIVE são classificados como definidos, semi-definidos e indefinidos. Os meios definidos são livres de soro, de células sanguíneas ou constituintes celulares. Os meios indefinidos são aqueles cuja composição apresenta o soro, componente biológico, constituído de uma mistura complexa de moléculas como, fatores de crescimento, hormônios e proteínas e os semi-definidos são meios intermediários (GORDON, 1994; FEUGANG et al., 2009). Sendo assim, os meios de cultivo podem ser suplementados com macromoléculas de origem animal, como a albumina sérica bovina (BSA) e o soro fetal bovino (SFB), ou com macromoléculas sintéticas, como o álcool polivinil (PVA), o álcool pirrolidona (PVP), o polissacarídeo Ficoll, e o meio comercial Knockout (MINGOTI et al., 2011), uma fonte proteica sintética usada comumente em cultivo de células tronco.

Os embriões bovinos normalmente são cultivados em meios indefinidos, pelo fato da suplementação proteica animal mostrar maior eficiência para o desenvolvimento embrionário (GOMEZ e DIEZ, 2000). Uma das funções do SFB e do BSA é a proteção do embrião no CIV contra a formação de radicais livres (BAVISTER, 1995). Sendo assim, o meio suplementado com soro fetal bovino (SFB) é o mais utilizado nos sistemas PIVE por proporcionar também maiores taxas de formação de embriões (LEIVAS et al.; 2011). Porém, inicialmente, o SFB nos sistemas de CIV atua inibindo ou atrasando as primeiras clivagens e o desenvolvimento inicial (GARDNER, 1998; THOMPSON, 2000), mas posteriormente, estimula e acelera a formação dos embriões (GORDON, 2003). Por isso, tem sido utilizado em meio de cultivo para que o desenvolvimento embrionário seja acelerado após o estágio de 8 a 16 células, resultando em blastocistos com maior número de células (VAN LANGENDONCKT et al., 1997; TRICOIRE

et al., 1999). Este é o estágio em que ocorre a ativação do genoma embrionário (AGE) (KOPECNY et al., 1989), que se refere ao momento a partir do qual o embrião passa a produzir seu próprio RNA mensageiro. No momento da fertilização, o oócito e o espermatozóide estão transcricionalmente silenciados ou inativos, e como consequência, o embrião, em seus estágios iniciais de desenvolvimento (até 8 a 16 células no bovino) sobrevive das reservas maternas de RNA mensageiro e proteína, acumulados durante o crescimento oocitário (KOPECNY et al., 1989). A transcrição deficiente, provavelmente devido as insuficiências dos meios de cultivo durante o desenvolvimento embrionário nessa fase (8 a 16 células), leva ao bloqueio do desenvolvimento embrionário.

Sabe-se que o uso do SFB nos sistemas de cultivos de embriões *in vitro* é bastante contraditório. O SFB possui vários componentes que melhoram o desenvolvimento embrionário como, albumina, ácidos graxos, aminoácidos, vitaminas, fatores de crescimento, componentes que quelam os metais pesados (ABE e HOSHI, 2003; BAVISTER, 1995; KRISHER et al., 1999), e que são essenciais para garantir uma melhor qualidade e desenvolvimento embrionário (CAMARGO et al., 2002; LAZZARI et al., 2002; RIZOS et al., 2003). Embriões produzidos em meio acrescidos de SFB apresentam blastocistos com maior número de células (LAZZARI et al., 2002; CAMARGO et al., 2002). No entanto, George et al. (2008) mostraram que cultivos livres de SFB garantem embriões de melhor qualidade, e melhor sobrevivência após a transferência.

Portanto, é devido à esse paradoxo da utilização do SFB na PIVE que estudos são realizados na tentativa de remover, substituir ou mesmo reduzir sua concentração nos sistemas

de cultivo (revisado em FEUGANG et al., 2009). Para isso, vários compostos têm sido propostos (BSA, PVP e PVA) (LIM et al., 2007; MINGOTI et al., 2011).

Com o exposto, pode-se observar que identificar os meios de cultivo ideais durante a PIVE não é tarefa fácil, pois os meios utilizados estão correlacionados com eventos moleculares extremamente importantes e que podem afetar sobremaneira o correto desenvolvimento embrionário.

Atmosfera gasosa

A atmosfera gasosa na produção *in vitro* de embriões é outra condição de cultivo de grande importância durante a PIVE. A tensão de oxigênio (O₂) é essencial para que ocorra a competência meiótica de oócitos e conseqüentemente, o bom desenvolvimento embrionário (SILVA et al., 2010). Sendo assim, existem várias pesquisas comparando as diferentes tensões de O₂ nos sistemas de cultivo com o objetivo de encontrar o sistema mais adequado.

A atmosfera gasosa em que os gametas e embriões são expostos durante a PIVE difere muito do cultivo *in vivo*. No ambiente da tuba uterina e do útero a tensão de oxigênio é menor (em torno de 3 a 9% O₂) comparada à tensão de O₂ que é comumente utilizada nos meios de cultivo (20% O₂) durante a PIVE no Brasil (THOMPSON et al., 1990; FISCHER e BAVISTER, 1993; LIM et al., 1999; VAN SOOM et al., 2002), a alta tensão de O₂ é geralmente mais utilizada principalmente devido ao fato de ser economicamente mais viável.

O oxigênio é fundamental para a sobrevivência celular, mas a alta concentração deste gás na atmosfera de cultivo produz naturalmente metabólitos, que são as espécies reativas

de oxigênio (ERO, do inglês ROS) (FATEHI et al., 2005; CORRÊA et al., 2007; BASINI et al., 2008; SILVA et al., 2010), como os radicais superóxidos (O₂⁻) e hidroxil (OH⁻) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (FEUGANG et al., 2004), gerando o estresse oxidativo, que pode ser prejudicial e até levar à morte de células em cultivo (SILVA et al., 2010). O estresse oxidativo ocorre quando a produção de ROS é superior à eficiência dos mecanismos endógenos protetores (FEUGANG et al., 2003).

Outros fatores também têm sido associados à formação das ROS, tais como as condições sub-ótimas de cultivo *in vitro*, concentrações elevadas de glicose e exposição à luz (HASHIMOTO et al., 2000; KITAGAWA et al., 2004). A produção das ROS gera o estresse oxidativo, que pode modificar de maneira importante a função celular (SILVA et al., 2010) e o desenvolvimento embrionário (GUÉRIN et al., 2001). Nos gametas e embriões, pode ocorrer peroxidação dos lipídios das membranas, danos ao DNA e morte celular por apoptose ou necrose (SILVA et al., 2010).

Apesar dos indícios de que as ROS são prejudiciais ao sistema de produção de embriões, sabe-se que, a presença destas ROS em baixas concentrações é fundamental, uma vez que elas agem como “segundo mensageiro” e modulam a expressão gênica que regula a maturação dos gametas, entre outros processos (FISSORE et al., 1996; LAMIRANDE et al., 1997).

Enquanto na MIV e CIV a adição de antioxidantes promove efeitos benéficos, supõe-se que o meio de fertilização *in vitro* (FIV) não deva conter antioxidante uma vez que os ROS são fundamentais para hiperativação, capacitação e reação acromossômica dos espermatozoides (CROCOMO, et al., 2012). Isto ilustra o desafio para determinar as condições ideais de O₂ no sistema de cultivo.

Ainda, muitos autores acreditam que a baixa tensão de O₂, como a tensão de 5%, seja mais adequada ao sistema de cultivo. Karja et al. (2004) revelaram que uma menor tensão (8-10%) de O₂ durante MIV, FIV e CIV melhora a qualidade embrionária em suínos. Preis et al. (2007) observaram que em camundongos a utilização de 5% de O₂ favoreceu o desenvolvimento embrionário, o que também foi visto em bovinos (YUAN et al., 2003). Em alguns trabalhos, pôde ser observado que os eventos moleculares também são prejudicados nos sistemas de PIVE com alta tensão de O₂, como dano no material genético sob a forma de fragmentação do DNA (TAKAHASHI et al., 2000; KITAGAWA et al., 2004). Em embriões suínos, o uso de antioxidantes, como o β-mercaptoetanol e vitamina E, reduziu os danos ao DNA quando os embriões foram cultivados em alta tensão de O₂ (KITAGAWA et al., 2004), o que mostra que a adição de antioxidantes ao meio de CIV pode reduzir os efeitos deletérios da alta tensão.

Por outro lado, outros autores comprovaram que a alta tensão de O₂ pode beneficiar certas etapas da PIVE. Hashimoto et al. (2000) observaram reduzida viabilidade oocitária com a utilização de baixa tensão de O₂ (5%). Em suínos, a alta tensão de O₂ (20%) na MIV também aumentou a taxa de formação de blastocistos quando comparada à baixa tensão (7%), enquanto no CIV, a tensão de O₂ não interferiu na formação dos blastocistos (PARK et al., 2005).

Há ainda trabalhos que mostram que diferentes tensões de O₂ não afetam a PIV. Em camundongos, diferentes concentrações de O₂ durante a MIV de embriões não afetaram a maturação oocitária, a fertilização, a clivagem e taxa de desenvolvimento de blastocisto bem como a taxa de implantação embrionária (BANWELL et al., 2007). Trabalhos

similares também mostraram que diferentes tensões de O₂ não afetaram a primeira clivagem e a progressão para os demais estádios embrionários (KHURANA e NIEMANN, 2000).

Somfai et al. (2010) utilizaram diferentes meios de cultivo durante a PIV de embriões bovinos e observaram que o uso do meio CR1aa resultou em altas taxas de formação de blastocistos independentemente da tensão O₂, enquanto o meio IVD101 apenas apresentou alta taxa de formação de blastocisto quando se associou o seu uso a uma baixa tensão de O₂. Já em meio SOF a diferença da tensão de O₂ não interferiu na produção de embriões bovinos (CORREA et al., 2008). Os embriões bovinos em atmosfera de 20% de O₂ apresentaram maior taxa de desenvolvimento embrionário quando comparado a de 5% em determinadas diferenças encontradas nestes estudos apontam para uma possível interação do meio e a tensão de O₂. Outro exemplo é o trabalho de Pereira et al. (2010) em que há evidência de interação entre a tensão de oxigênio e suplementação dos meios durante MIV, influenciando o desenvolvimento do embrião bovino.

Observa-se que apesar dos muitos estudos na área, há ainda grandes variações nos resultados sobre a atmosfera gasosa ideal. Dessa forma, para se estabelecer um protocolo verdadeiramente eficiente sobre a tensão de O₂ são necessárias novas pesquisas que, além de avaliarem a porcentagem de desenvolvimento embrionário, visem entender também os efeitos destas diferentes tensões de O₂ na fisiologia embrionária e nos eventos moleculares durante o período de cultivo *in vitro*.

EFEITOS DOS ANTIOXIDANTES

Espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas naturalmente durante o metabolismo celular. Em condições

in vitro, a produção destas substâncias é potencializada pela presença de altas tensões de oxigênio (O₂), gerando o estresse oxidativo. Esta condição pode ser prejudicial a diferentes processos fisiológicos, requeridos para o desenvolvimento normal de diferentes células e estruturas. Em gametas e embriões, os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio envolvem peroxidação dos lipídios das membranas, danos ao DNA e morte celular por apoptose ou necrose (SILVA et al., 2010).

Em oócitos de humanos, bovinos e suínos, estudos têm sugerido que 2% de O₂ podem afetar a fosforilação oxidativa e conseqüentemente, a síntese de ATP, além de apresentarem alta correlação com anormalidades cromossômicas e diminuição na taxa de gestação (CHUI et al., 1997). Por outro lado, 20% de O₂ representam uma condição não fisiológica, possibilitando o aumento do estresse oxidativo durante a maturação, contribuindo, assim, para a ocorrência de alterações citogenéticas (BANWELL et al., 2007). Dessa forma, apesar da grande variação nos resultados, concentrações intermediárias, por se aproximarem dos níveis fisiológicos, parecem ser as mais benéficas durante a maturação oocitária (HARVEY, 2007).

Sistemas de defesa antioxidantes

Para se proteger, a célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas. Uma delas atua como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão. Esta linha é constituída por glutathione reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathione-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

A outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathione-redutase (GSH-Rd) e pela GSHPx, entre outros. Com exceção da

vitamina E (α-tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Para proteger os oócitos e embriões de estresse oxidativo durante o cultivo *in vitro*, vários antioxidantes podem ser adicionados ao meio de cultura (ALI et al., 2003). Antioxidante pode ser definido como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas àquela do substrato oxidável, retarda ou previne, significativamente, a oxidação daquele substrato. Em condições normais, os antioxidantes convertem ROS em água para prevenir a superprodução destes compostos (SILVA et al., 2010).

Como proteção aos efeitos nocivos do excesso de metabólitos de oxigênio, o organismo dispõe de dois sistemas antioxidantes: não enzimáticos e enzimáticos. Estes atuam em diferentes níveis de proteção: inibindo a formação e ação oxidativa das ROS, e reparando as lesões provocadas pelos metabólitos oxidativos (CROCOMO et al., 2012).

Antioxidantes não enzimáticos são conhecidos como antioxidantes sintéticos ou suplementos da dieta. Inclui compostos de baixo peso molecular presentes na dieta como ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), selênio, zinco, taurinas, hipotaurinas, caroteno e ácido lipoico. Também são incluídos os compostos tióis como: cistina, cisteína, cisteamina e beta-mercaptoetanol, utilizados nos meios de cultivo oocitário e embrionário *in vitro* (CROCOMO et al., 2012).

Ácido ascórbico (Vitamina C)

A vitamina C ou ascorbato é uma vitamina hidrossolúvel com ação antioxidante. O ácido ascórbico reduz o α-tocoferol,

os peróxidos e as ROS, como superóxido. Esta vitamina serve, principalmente, para prevenir a formação de hidroperóxido de lipídios nas lipoproteínas plasmáticas e de membrana. O ascorbato atua juntamente com a glutathione para proteger a célula dos danos oxidativos (NORDBERG e ARNÉR, 2001). Essa vitamina tem sido associada à manutenção da viabilidade celular no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais (SILVA et al., 2010). No entanto, quando em doses elevadas ou na presença de metais como o ferro ou o cobre, a vitamina C pode agir como um pró-oxidante, levando à lipoperoxidação. *In vitro*, tanto a mistura Cu-ascorbato como Fe-ascorbato estimulam os danos oxidativos causados por radicais livres ao DNA, aos lipídios e às proteínas (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

α-Tocoferol (Vitamina E)

O tocoferol, ou vitamina E, é conhecido como o principal antioxidante lipossolúvel que protege os ácidos graxos poli-insaturados dos tecidos contra a peroxidação. Ele é um potente removedor de radicais peroxil (LOO•) e, provavelmente, o mais importante inibidor da reação em cadeia da lipoperoxidação em animais (ANDRADE et al., 2011). Faz-se necessário destacar que os efeitos do tocoferol podem variar com a dose utilizada, pois, de acordo com a quantidade de radicais hidroxilas a serem inativados, o tocoferol poderá ter o efeito antioxidante ou estimular a oxidação (ANDRADE et al., 2011). Uma quantidade significativa de tocoferol está presente no ovário e no fluido folicular, o que sugere sua ação sobre o sistema reprodutor feminino (ANDRADE et al., 2011). A adição de tocoferol ao meio de cultivo de embriões bovinos melhorou a competência de desenvolvimento ao estágio de blastocisto (ANDRADE et al., 2011), além de ter suprimido os danos oxidativos e potencializado o desenvolvimento de embriões suínos (ANDRADE et al., 2011). A vitamina E é um componente vital da fisiologia ovariana normal.

Ácido lipoico

O ácido lipoico (ácido 1,2-ditiolano-3-pentanoico) é um cofator essencial em complexos multi-enzimáticos que catalisam a descarboxilação dos α-cetoácidos, como o piruvato (α-acetil coenzima-A - CoA) e o α-cetoglutarato (α-succinil CoA) no ciclo de Krebs. Ambas as formas, oxidadas e reduzidas, do ácido lipoico mostram propriedades antioxidativas *in vitro*. Estas substâncias reduzem peróxido, ácido hipocloroso, radical hidroxila e ácido peroxinitroso. As concentrações de ácido lipoico livre nos tecidos e fluidos corporais são muito baixas, o que torna quase impossível que ele exerça efeitos antioxidativos *in vivo* (SILVA et al., 2011).

Antioxidantes enzimáticos

Antioxidantes enzimáticos são conhecidos como antioxidantes naturais. Eles neutralizam as ROS excessivas e previnem danos à estrutura celular (SILVA et al., 2010). Inclui as enzimas superóxido dismutase, catalase, peroxirredoxinas e o sistema glutathione redutase/peroxidase. A superóxido dismutase é responsável por catalisar a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, enquanto que as peroxirredoxinas degradam o peróxido de hidrogênio e a catalase o converte à água e oxigênio. Já o sistema glutathione redutase/peroxidase consiste no mecanismo de defesa primário para remoção das ROS (CROCOMO et al., 2012).

A superóxido dismutase foi a primeira enzima metabolizante de espécies reativas de oxigênio descoberta. Em células de mamíferos, existem duas formas desta enzima: a Cu, Zn- superóxido dismutase (Cu- Zn- SOD) presente no citosol e a Mn- superóxido dismutase (Mn-SOD) presente na mitocôndria.

Estas enzimas catalisam a reação de dismutação de duas moléculas do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$; sendo, portanto, uma fonte de peróxido de hidrogênio celular. Na mitocôndria, o superóxido é formado em concentrações relativamente altas, devido ao escape de elétrons da cadeia respiratória (SILVA et al., 2011).

A catalase é uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio a água e oxigênio molecular ($H_2O_2 = H_2O + O$). É uma enzima encontrada no sangue, na medula óssea, nas mucosas, nos rins e no fígado. A catalase também tem função na detoxificação de diferentes substratos, como fenóis e álcoois, via redução acoplada do H_2O_2 . Um papel antioxidativo da catalase é diminuir o risco de formação do radical hidroxila a partir do H_2O_2 via reação de Fenton. Para aumentar sua eficiência e protegê-la da inativação, a catalase se liga ao NADPH (SILVA et al., 2011).

Peroxirredoxinas simulam uma larga família de enzimas citoprotetoras que degradam o peróxido de hidrogênio, além de peróxidos orgânicos de cadeias mais longas e hidrofóbicas, como o peróxido de cumeno, os peróxidos derivados de ácidos graxos ou de fosfolipídeos, além do peroxinitrito. Ao degradarem esses compostos, as peroxirredoxinas ficam em sua forma oxidada e, para terem a sua atividade enzimática restaurada, devem ser reduzidas por enzimas denominadas tiorredoxinas. As tiorredoxinas, por sua vez, só atuam na sua forma reduzida, e essa redução é feita pela enzima tiorredoxina redutase, formando, assim, um ciclo catalítico entre essas diferentes enzimas citadas. Em mamíferos, essas enzimas também podem atuar em outras moléculas e processos

metabólicos, como no sistema imune, na apoptose celular e na regulação da atividade de fatores de transcrição, regulando a função celular de vários tecidos (SILVA et al., 2011).

A Glutathione pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula dos mamíferos (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; CROCOMO et al., 2012), protegendo-as de lesões resultantes da exposição a agentes como: íons ferro, oxigênio hiperbárico, ozônio, radiação e luz ultravioleta (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Incide num tripeptídeo composto pelos aminoácidos: glutamato, glicina e cisteína. Este composto fica entrelaçado em inúmeros papéis biológicos, sendo conhecido principalmente pelo seu potencial de proteger as células contra os efeitos citotóxicos das ROS e manter o potencial redox intracelular (CROCOMO et al., 2012). Age também como cofator de enzimas, na estocagem de cisteína e na regulação da síntese de proteínas e de DNA por meio da alteração do status redox (SILVA et al., 2011). Apresenta-se no organismo sob duas formas: glutathione reduzida (GSH), que proporciona capacidade redutora determinada pelo grupamento sulfidril (-SH) e é predominante no meio intracelular; e a glutathione oxidada (GSSG), que é um dissulfeto resultante da oxidação da GSH após sua exposição ao agente oxidante (CROCOMO et al., 2012).

No processo de neutralização das ROS, a glutathione opera em ciclos entre a sua forma reduzida e oxidada. As reações de redução e oxidação são catalisadas pelas enzimas glutathione peroxidase (GPx) e redutase (GR) e ocorrem na presença de selênio e NADPH, respectivamente (CROCOMO et al., 2012).

A glutathione peroxidase catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio à água, utilizando a GSH como agente redutor que,

consequentemente, é convertida à sua forma oxidada (GSSG) (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; NORDBERG & ARNÉR, 2001; CROCOMO et al., 2012). Numa situação de equilíbrio, a glutathione redutase imediatamente converte a GSSG à sua forma reduzida (GSH), utilizando o NADPH como agente redutor (CROCOMO et al., 2012). Para manter íntegro o sistema de proteção celular, a recuperação da GSH é essencial. Isso depende da nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) gerada pela oxidação da glicose na via das pentoses-fosfato. Qualquer desequilíbrio neste processo resultará em menor concentração intracelular de GSH favorecendo o estresse oxidativo (CROCOMO et al., 2012).

Uso de antioxidantes no cultivo embrionário de embriões bovinos

Devido às suas inúmeras funções biológicas, em especial à atividade antioxidante, a glutathione está diretamente relacionada ao potencial de desenvolvimento oocitário e embrionário tanto *in vivo* como *in vitro* (CROCOMO et al., 2012).

A glutathione está presente no oócito e no fluido folicular, desempenhando função no desenvolvimento do zigoto do estágio de mórula para blastocisto. Foi identificada como essencial para maturação de oócitos, principalmente na maturação citoplasmática (SILVA et al., 2011).

Estudos indicam que a concentração intraoocitária de glutathione aumenta ao longo da maturação, de forma que, oócitos no estágio de metáfase II apresentam o dobro da quantidade de GSH detectada na fase de vesícula germinativa. Esta síntese de GSH durante a maturação pode ser regulada por gonadotrofinas. No estágio inicial do desenvolvimento embrionário, diminui rapidamente o nível de GSH, sendo que

sua síntese é retomada apenas com a ativação do genoma embrionário. Logo, o estoque de GSH intraoocitário assegura a proteção contra as ROS durante a fertilização e desenvolvimento embrionário inicial e, consequentemente, determina a competência oocitária (CROCOMO et al., 2012).

Há tipos e funções diferentes de glutathione peroxidase: exerce dupla função na célula espermática, atua como enzima ativa na espermátide e funciona como proteína estrutural, no espermatozoide maduro (SILVA et al., 2011). Além de sua ação antioxidante, a GSH participa ativamente na descondensação do material genético espermático, formação do pronúcleo masculino e manutenção do potencial redox intracelular (GASPARINI et al., 2005; CROCOMO et al., 2012).

Desta forma, a glutathione, em seu formato reduzido, pode ser considerada um potencial marcador bioquímico da maturação, viabilidade e potencial de desenvolvimento oocitário. Entretanto, nos oócitos maturados *in vitro*, a concentração intracelular de GSH é mínima do detectado *in vivo*. Isto ocorre por causa da elevada e contínua produção de ROS nos sistemas de cultivo *in vitro* decorrente da elevada concentração de O₂, interferência da luz e presença de espermatozoides. Estas condições resultam em maior mobilização da GSH e, consequentemente, maior susceptibilidade ao estresse oxidativo. *In vivo*, os oócitos e embriões estão protegidos contra o estresse oxidativo pela presença de antioxidantes no fluido folicular e oviduto. Entretanto, na PIV, os oócitos são retirados do ambiente natural e submetidos às condições de cultivo distintas do fisiológico o que favorece o estresse oxidativo. Como consequência, podem ser constatadas alterações mitocondriais, apoptose, bloqueio da meiose oocitária e do desenvolvimento embrionário (CROCOMO et al., 2012).

Deste modo, a síntese de GSH nos oócitos e embriões depende da disponibilidade de aminoácidos precursores no meio extracelular e de um sistema de condução destes aminoácidos pela membrana plasmática. Fundamentado nisso, os meios de cultivo padrão, como TCM199, são normalmente enriquecidos com aminoácidos como cisteína e/ou cistina. Decorrências benéficas da cisteína nos meios MIV e CIV têm sido propostas em bovinos e suínos, entretanto, embora exista discordância entre autores com relação aos resultados obtidos. Apesar de a cisteína ser diretamente aproveitada pelo oócito e embrião para síntese de glutatona, sua estabilidade no meio extracelular é muito baixa, sendo oxidada em cistina em uma hora de cultivo (GASPARINI et al., 2005; CROCOMO et al., 2012).

Resultados de estudos indicam que tanto oócitos desnudos como embriões não conseguem utilizar a cistina presente no meio de cultivo, possivelmente pela falta de um sistema de transporte transmembrana de cistina ou pela incapacidade de conversão desta em cisteína (CROCOMO et al., 2012).

A suplementação do meio de cisteína estimula a síntese de GSH apenas em oócitos que apresentam células *documulus compacta*, em bovinos. Sugerindo que as células de cumulus tenham papel de suma importância por meio da conversão de cistina em cisteína, que é então incorporado na síntese de GSH. Com isso, quando o meio é suplementado com cisteína ou cisteamina, o conteúdo de GSH está aumentado nos oócitos na ausência de células de *cumulus* (GASPARINI et al., 2005; CROCOMO et al., 2012).

Quando acrescentados compostos de tióis de baixo peso molecular, tais como a cisteamina e o beta-mercaptoetanol, a suplementação do meio de cultivo *in vitro* com cistina e/

ou cisteína consiste em uma alternativa para aumentar a concentração intracelular de GSH (GASPARINI et al., 2005; CROCOMO et al., 2012). Evidências indicam que tal estratégia resulta em maior eficiência da PIVE (CROCOMO et al., 2012).

Em suma, estudos mostram ainda maiores taxas de blastocistos e diminuição da apoptose, em diversas espécies animais, quando os meios MIV e CIV foram suplementados com cisteamina e/ou beta-mercaptoetanol associados à cistina e/ou cisteína. Vale ressaltar, no entanto, que os efeitos positivos ou negativos do uso de antioxidantes dependem da concentração destes no meio extracelular, do tempo de cultivo e da espécie animal em questão (CROCOMO et al., 2012). Vale ressaltar que, enquanto na MIV e CIV, a adição de antioxidantes promove efeitos benéficos, supõe-se que o meio de fertilização *in vitro* (FIV) não deve conter antioxidante uma vez que as ROS são fundamentais para hiperativação, capacitação e reação acrossômica dos espermatozoides (CROCOMO et al., 2012).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De modo geral, é evidente que o estresse oxidativo decorrente das técnicas de reprodução assistida não pode ser evitado. Entretanto, o excesso durante a PIV pode ser superado através da diminuição na produção de ROS, utilizando-se reduzida tensão de oxigênio durante o CIV e/ou suplementação dos meios de cultivo com antioxidantes. Objetiva-se, portanto, que a produção de ROS e os mecanismos antioxidantes estejam em constante equilíbrio, visto que funções fisiológicas relacionadas à reprodução podem ser comprometidas.

REFERÊNCIAS

Basini G, Simona B, Santini SE, Grasselli F. 2008. Reactive oxygen species and antioxidant defences in swine follicular fluids. *Reproduction, Fertility and Development*, 20: 269-274.

Besenfelder U, Havlicek V, Bream G. 2012. Role of the oviduct in early embryo development. *Reprod Domest Anim*, 47, n.4, p. 156-163.

Bavister BD. 1995. Culture of preimplantation embryos: facts and artefacts. *Hum. Reprod*, 1: 91-148.

De Matos DG, Furnus CC, Moses DF. 1997. Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. *Biol. Reprod.*, 57: 1420-1425.

Duranthon V, Watson JA, Lonergan P. 2008. Preimplantation embryo programming: transcription, epigenetics, and culture environment. *Reproduction*, 135: 141-150.

Fatehi AN, Roelen BA, Colenbrander B, Schoevers EJD, Gadella BM, Van Den Hurk R. 2005. Presence of cumulus cells during in vitro fertilization protects the bovine oocyte against oxidative stress and improves first cleavage but does not affect further development. *Zygote*, 13:177- 185.

Felmer RN, Arias ME, Muñoz GA, Rio, E.J.H. 2011. Effect of different sequential and two-step culture systems on the development, quality, and RNA expression profile of bovine blastocysts produced in vitro. *Mol Reprod Dev*, 78: 403-414.

Feugang JM, Camargo-Rodriguez O, Memili E. 2009. Culture systems for bovine embryos. *Livestock Science*, 121:141-149.

Garcia JM, Avelino KB, Vantini R. 2005. Estado da arte da fertilização in vitro em bovinos. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal aplicada, 1, Londrina, PR. Biotecnologia da reprodução em bovinos. Londrina, PR: UEL, p.201.

Gardner D. 1998. Changes in requirement and utilization of nutrients during mammalian pre implantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology*, 49:83-102.

Gomez E, Diez C. 2000. Effects of glucose and protein sources on bovine embryo development in vitro. *Animal Reproduction Science*, 58:23-37.

Gordon I. 2003. Laboratory production of cattle embryos. Maturing the bovine oocytes. 2 ed. Cambridge University Press, cap. 4. 112-157.

Goto Y, Noda Y, Mori T, Nakano M. 1993. Increased generation of reactive oxygen species in embryo cultured in vitro. *Free Rad. Biol. Med.*, 15: 69-75.

Greve T, Avery B, Callesen H. 1993. Viability of in vivo and in vitro produced embryos. *Reprod Domest Anim*, 28:164-169.

Hansen PJ, Block J, Loureiro B, Bonilla L, Hendricks KEM. 2010. Effects of gamete source and culture conditions on the competence of in vitro - produced embryos for post-transfer survival in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 22:59-66.

Imai K, Matoba S, Dochi O, Shimohira I. 2002. Different factors affect developmental competence and cryotolerance in in vitro produced bovine embryo. *Theriogenology*, 64:887-891.

Harvey AJ. 2007. The role of oxygen in ruminant pre implantation embryo development and metabolism. *Anim Reprod Sci*, 98:113-128.

Khurana NK, Nieman H. 2000. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology*, 54:741-766.

Kopečný V, Flechon JE, Camous S, Fulka JJR. 1989. Nucleogenesis and the onset of transcription in the eight-cell bovine embryo: Fine-structural autoradiographic study. *Molecular Reproduction and Development*, 1:79-90.

Leivas FG, Brum DS, Fialho SS, Saliba WP, Alvim MTT, Bernardic ML, Rubin MIB, Silva CAM. 2011. *Theriogenology*, 75:429-433.

Machaty Z, Peippo J, Peter S. 2012. Production and manipulation of bovine embryo: techniques and terminology. *Theriogenology*, 78:937-950.

Mingoti GZ, Castro VSDC, Méo SC, Barreto LSS, Garcia JM. 2011. The effects of macromolecular and serum supplements and oxygen tension during bovine in vitro procedures on kinetics of oocyte maturation and embryo development. *In vitro Cell. Biol. Animal*, 47:361-367.

Niemann H, Wrenzycki C. 2000. Alterations of expression of developmentally important genes in pre implantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology*, 53:21-34.

Noda Y, Matsumoto H, Maoka H, Tatsumi K, Kishi J, Mori T. 1991. Involvement of superoxide radicals in the mouse 2-cell block. *Mol. Reprod. Dev.*, 28:356-260.