

PRODUÇÃO DE EMBRIÕES *IN VITRO*: ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES

Letícia Ferrari Crocomo^{1*}
Wolff Camargo Marques Filho²
Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga^{3*}
Sony Dimas Bicudo^{3*}

RESUMO

A produção contínua e excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) associada à depleção da concentração intracelular de glutathione (GSH) são as principais causas da baixa eficiência da produção *in vitro* de embriões (PIV) em diversas espécies animais. Isto se deve às condições de cultivo *in vitro* e à ausência do sistema de defesa antioxidante materno. Dentre os efeitos deletérios do estresse oxidativo, a peroxidação lipídica tem sido relacionada com o bloqueio do desenvolvimento e redução da viabilidade oocitária e embrionária. Neste contexto, a suplementação dos meios de cultivo *in vitro* com compostos tiois tem sido proposta com intuito de reduzir as perdas decorrentes do estresse oxidativo. Sendo assim, dada a relevância do tema, esta revisão visa proporcionar melhor compreensão dos eventos bioquímicos envolvidos na formação das EROs, na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante glutathione reductase/peroxidase, com enfoque aos oócitos e embriões, e discutir alternativas para melhorar a eficiência da PIV.

Palavras-chave: oócito, embrião, glutathione, compostos tiois, lipoperoxidação

IN VITRO EMBRYO PRODUCTION: OXIDATIVE STRESS AND ANTIOXIDANTS

ABSTRACT

The continuous and excessive production of reactive oxygen species (EROs) associated with the depletion of intracellular concentration of glutathione (GSH) are the main cause of low efficiency of *in vitro* embryo production (PIV) in several animal species. It is due the *in vitro* culture conditions and the absence of the maternal antioxidant defense system. Among the deleterious effects of oxidative stress, lipid peroxidation has been related to the development block and reduction of the oocyte and embryo viability. In this context, the supplementation of the *in vitro* culture media with thiol compound has been proposed in order to reduce losses resulting from oxidative stress. Thus, considering the topic relevance, this review aims to provide better understanding of the biochemical events involved in the EROs formation, lipid peroxidation and antioxidant defense system glutathione reductase/peroxidase, focusing on oocytes and embryos, and to discuss alternatives to improve the PIV efficiency.

Keywords: oocyte, embryo, glutathione, thiol compounds, lipoperoxidation

¹ Médica Veterinária doutoranda em Reprodução Animal, bolsista FAPESP, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil. E-mail: lfrocomo@hotmail.com.

² Pós-graduando da FMVZ-UNESP Botucatu, São Paulo, Brasil.

³ Prof. Dr. do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ – UNESP, Botucatu, São Paulo

* Correspondência: Distrito de Rubião Jr, s/n, CEP 18618-000 Botucatu – SP

PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *IN VITRO*: EL ESTRÉS OXIDATIVO Y LOS ANTIOXIDANTES

RESUMEN

La producción continua y excesiva de especies reactivas de oxígeno (EROs) asociada con la depleción de glutatión (GSH) intracelular son las principales causas de la baja eficiencia en la producción de embriones *in vitro* (PIV) en varias especies animales. Esto es debido a las condiciones de cultivo *in vitro* y a la ausencia del sistema de defensa antioxidante materno. Entre los efectos nocivos del estrés oxidativo, la peroxidación lipídica se ha relacionado con el bloqueo del desarrollo y la reducción de la viabilidad de ovocitos y embriones. En este contexto, se ha propuesto la suplementación de los medios de cultivo *in vitro* con compuestos tiol con el fin de reducir las pérdidas resultantes del estrés oxidativo. Así, dada la relevancia del tema, esta revisión tiene como objetivo proporcionar una mejor comprensión de los eventos bioquímicos que intervienen en la formación de las EROs, en la peroxidación lipídica y en el sistema de defensa antioxidante glutatión reductasa / peroxidasa, con enfoque en ovocitos y embriones, y discutir alternativas para mejorar la eficiencia de la PIV.

Palabras clave: ovocitos, embriones, glutatión, compuestos tiol, peroxidación lipídica

INTRODUÇÃO

Apesar dos recentes avanços biotecnológicos, a eficiência da PIV em diferentes espécies animais ainda é baixa quando comparada aos resultados obtidos *in vivo* (1-3). Dentre os fatores implicados neste contexto, a qualidade dos oócitos e as condições dos sistemas de maturação oocitária e cultivo embrionário *in vitro* são determinantes (4, 5).

In vitro, a produção de EROs é favorecida pela alta tensão de oxigênio (O₂) associada à interferência da luz, à presença de espermatozoides e à ausência da proteção antioxidante materna. Para reestabelecer o potencial redox intracelular, grande quantidade de glutatona é mobilizada resultando em maior susceptibilidade ao estresse oxidativo (6, 7). Como consequência, reações em cadeia são desencadeadas promovendo danos celulares que resultam em altas taxas de apoptose e bloqueio da meiose oocitária e do desenvolvimento embrionário *in vitro* (8, 9).

Neste contexto, a suplementação dos meios de maturação oocitária (MIV) e cultivo embrionário *in vitro* (CIV) com compostos tióis, capazes de incrementar o sistema de defesa antioxidante intracelular, tem sido proposta com intuito de melhorar eficiência da PIV (10, 11).

Deste modo, dada a relevância do tema, esta revisão visa ampliar o conhecimento referente aos eventos bioquímicos envolvidos na formação das EROs, na lipoperoxidação e no sistema de defesa antioxidante glutatona reductase/peroxidase ao longo do desenvolvimento oocitário e embrionário tanto *in vivo* como *in vitro*. Alternativas para incrementar a eficiência da PIV pela utilização de antioxidantes nos meios de cultivo *in vitro* também serão abordadas.

ESTRESSE OXIDATIVO

Consiste num termo genérico dado à situação em que existe desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio e as substâncias antioxidantes, com predominância das primeiras. Nos sistemas de cultivo *in vitro*, o estresse oxidativo consiste numa das principais causas da baixa eficiência da maturação oocitária e desenvolvimento embrionário em várias espécies (8, 12). Além disso, está envolvido no envelhecimento celular e na patogênese de

muitas doenças como o câncer, ataque cardíaco, derrame, diabetes, doenças hepáticas entre outras (13).

As EROs são naturalmente geradas durante o metabolismo aeróbico, mesmo em condições basais (9). Deste modo, estão presentes em todos os tipos celulares. Numa situação de equilíbrio, exercem efeitos benéficos atuando como moléculas sinalizadoras em processos fisiológicos como na regeneração tecidual, sinalização hormonal, esteroidogênese, regulação redox intracelular e embriogênese (14).

No entanto, quando a concentração crítica de EROs é ultrapassada, ocorrem efeitos prejudiciais às células, resultando em alteração e morte celular (8). Além do metabolismo intracelular, o estresse oxidativo também pode ser favorecido pelas condições ambientais às quais oócitos e embriões são submetidos durante a PIV. Tais condições envolvem a concentração de oxigênio, presença de espermatozoides, constituintes do meio e exposição à luz ou calor (9).

FORMAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Durante a respiração celular, a molécula de oxigênio (O_2) deve receber quatro elétrons e ser completamente reduzida a duas moléculas de água (H_2O). Se o O_2 for parcialmente reduzido pela recepção de somente 1 elétron, o produto desta redução será o radical superóxido (O_2^-). Este radical, ao receber mais um elétron e 2 íons de hidrogênio, formará o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Da reação entre o peróxido de hidrogênio e íons de ferro ou cobre ocorrerá a formação do radical hidroxila (OH^\cdot), considerado o mais reativo (Figura 1). Este último também poder ser formado pela reação entre o peróxido de hidrogênio e superóxido (15, 16).

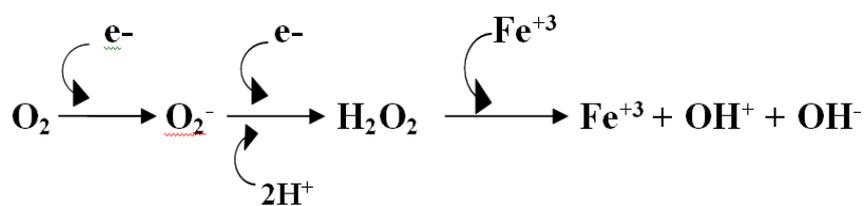


Figura 1. Reações químicas que resultam na formação das espécies reativas de oxigênio. Modificado de Ferreira e Matsubara (15).

Os radicais superóxidos e hidroxilas são considerados radicais livres, pois possuem elétrons desemparelhados em sua órbita mais externa. O peróxido de hidrogênio, apesar de não ser um radical livre, representa um metabólito parcialmente reduzido (17). Logo, todos estes metabólitos derivados do oxigênio são denominados espécies reativas de oxigênio em função da elevada instabilidade e reatividade (18).

Para se tornarem estáveis, as EROs precisam adquirir elétrons. Sendo assim, reagem com quaisquer moléculas ao seu redor (lipídios, carboidratos, ácidos nucleicos) provocando a oxidação destas. Como consequência, reações em cadeia são desencadeadas resultando em danos celulares que incluem: peroxidação lipídica, alterações mitocondriais, desnaturação protéica, bloqueio no desenvolvimento embrionário, redução da motilidade espermática, alteração do fuso meiótico, depleção de ATP e apoptose celular (8, 9).

PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA OU LIPOPEROXIDAÇÃO

Definida como “a deteriorização oxidativa dos ácidos graxos poliinsaturados (AGPI)”, a lipoperoxidação consiste numa reação em cadeia desencadeada pela ação das EROs sobre os

AGPI, resultando em alterações celulares irreversíveis (19). Devido a isso, é considerada um dos mais importantes efeitos citotóxicos decorrentes do estresse oxidativo (20).

O processo de lipoperoxidação se inicia com o sequestro de um átomo de hidrogênio dos AGPI pelas EROs. Por ser mais instável e reativo, o radical hidroxila (OH^\cdot) é considerado o agente desencadeador da reação. Como consequência, há formação de radicais lipídicos alquila (L^\cdot), que rapidamente reagem com uma molécula de oxigênio (O_2) formando os radicais peroxila (LOO^\cdot). Estes, por sua vez, para se estabilizarem, abstraem átomos de hidrogênio dos AGPI, resultando na formação de novos radicais lipídicos. Esta reação em cadeia se propaga até os radicais lipídicos destruírem a si próprios (15, 21), conforme demonstrado na figura 2.



Figura 2. Reações químicas que representam a lipoperoxidação. Modificado de Ferreira e Matsubara (15).

Dentre os componentes celulares, as membranas são mais susceptíveis à deteriorização lipídica, devido à grande quantidade de AGPI. As alterações decorrentes deste processo incluem: destruição da estrutura e alteração da permeabilidade das membranas celulares. Consequentemente, há perda da seletividade para entrada e saída de nutrientes e substâncias tóxicas, liberação do conteúdo das organelas, formação de produtos citotóxicos e alteração do DNA, culminando com a morte celular (22, 23).

Nas biotecnologias reprodutivas, a lipoperoxidação decorrente do estresse oxidativo é considerada uma das principais causas da baixa fertilidade dos espermatozoides submetidos aos processos de criopreservação e da baixa eficiência dos sistemas de cultivo oocitário e embrionário *in vitro* (24, 25).

Evidências indicam que o excesso de EROs na PIV induz o bloqueio do desenvolvimento e compromete a viabilidade oocitária e embrionária. Estes comprometimentos ocorrem devido às lesões estruturais e funcionais promovidas pela deteriorização oxidativa dos AGPI (6).

SISTEMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTE

As EROs são continuamente geradas como consequência direta do metabolismo de O_2 (9). 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 EROs, e reparando as lesões provocadas pelos metabólitos oxidativos (26).

Sistema antioxidante não enzimático

Inclui compostos de baixo peso molecular presentes na dieta como ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), selênio, zinco, taurinas, hipotaurinas, caroteno, ácido lipóico (9). Também são incluídos os compostos tióis como: cistina, cisteína, cisteamina e beta-mercaptoetanol, utilizados nos meios de cultivo oocitário e embrionário *in vitro* (10).

Sistema antioxidante enzimático

Inclui as enzimas superóxido dismutase, catalase, peroxirredoxinas e o sistema glutaciona 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 glutaciona redutase / peroxidase consiste no mecanismo de defesa primário para remoção das EROs (15, 18).

SISTEMA GLUTATIONA REDUTASE/PEROXIDASE

A Glutaciona é o maior e mais importante composto tiol-sulfidril não protéico, presente em todas as células dos mamíferos. Consiste num tripeptídeo formado pelos aminoácidos: glutamato, glicina e cisteína. Este composto está envolvido em inúmeras funções biológicas, sendo conhecido principalmente pelo seu potencial de proteger as células contra os efeitos citotóxicos das EROs e manter o potencial redox intracelular (12).

No organismo, se apresenta sob 2 formas: glutaciona reduzida (**GSH**), que apresenta capacidade redutora determinada pelo grupamento sulfidril (-SH) e é predominante no meio intracelular; e a glutaciona oxidada (**GSSG**), que é um dissulfeto resultante da oxidação da GSH após sua exposição ao agente oxidante (27).

No processo de neutralização das EROs, a glutaciona opera em ciclos entre a sua forma reduzida e oxidada. As reações de redução e oxidação são catalisadas pelas enzimas glutaciona peroxidase (GPx) e redutase (GR) e ocorrem na presença de selênio e NADPH, respectivamente (12).

Conforme representado na figura 3, a glutaciona peroxidase catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio à água, utilizando a GSH como agente redutor que, conseqüentemente, é convertida à sua forma oxidada (GSSG). Numa situação de equilíbrio, a glutaciona redutase imediatamente converte a GSSG à sua forma reduzida (GSH), utilizando o NADPH como agente redutor (27, 28).

A recuperação da GSH é essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular. Este processo depende da nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) que é gerada pela oxidação da glicose na via das pentoses-fosfato (12). Qualquer desequilíbrio neste processo resultará em menor contração intracelular de GSH favorecendo o estresse oxidativo.

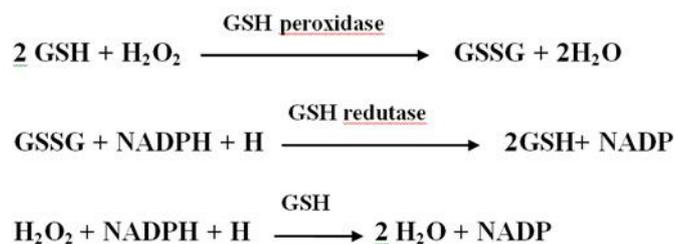


Figura 3. Reações químicas que representam a dismutação do peróxido de hidrogênio pelo sistema glutaciona redutase/ peroxidase. Modificado de Lubberda (12).

GLUTATIONA DURANTE O DESENVOLVIMENTO OOCITÁRIO E EMBRIONÁRIO *IN VIVO* X *IN VITRO*

Devido às suas inúmeras funções biológicas, em especial à atividade antioxidante, a glutaciona está diretamente relacionada ao potencial de desenvolvimento oocitário e embrionário tanto *in vivo* como *in vitro* (12).

Evidências indicam que a concentração intraoocitária de glutaciona aumenta ao longo da maturação, de modo que, oócitos no estadiu de metáfase II apresentam o dobro da quantidade

de GSH detectada no estágio de vesícula germinativa. Esta síntese de GSH durante a maturação pode ser regulada por gonadotrofinas (29).

No entanto, no estágio inicial do desenvolvimento embrionário, o nível de GSH diminui rapidamente, sendo que sua síntese é retomada apenas com a ativação do genoma embrionário. Logo, o estoque de GSH intraoocitário assegura a proteção contra as EROs durante a fertilização e desenvolvimento embrionário inicial e, conseqüentemente, determina a competência oocitária (30, 31).

Além da ação antioxidante, a GSH participa ativamente na descondensação do material genético espermático, formação do pronúcleo masculino e manutenção do potencial redox intracelular (32). Deste modo, a glutathiona, em sua forma reduzida, pode ser considerada um potencial marcador bioquímico da maturação, viabilidade e potencial de desenvolvimento oocitário (29).

No entanto, nos oócitos maturados *in vitro*, a concentração intracelular de GSH é bem menor do detectado *in vivo*. Isto se deve à elevada e contínua produção de EROs 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, conseqüentemente, maior susceptibilidade ao estresse oxidativo (6, 7).

Além disso, *in vivo*, os oócitos e embriões estão protegidos contra o estresse oxidativo pela presença de antioxidantes no fluido folicular e oviduto (33). No entanto, na PIV, os oócitos são removidos do ambiente natural e submetidos às condições de cultivo distintas do fisiológico o que favorece o estresse oxidativo (6). Como consequência, podem ser constatadas alterações mitocondriais, apoptose, bloqueio da meiose oocitária e do desenvolvimento embrionário (8).

Neste contexto, com intuito de minimizar os efeitos citotóxicos decorrentes do estresse oxidativo e conseqüentemente melhorar a eficiência da PIV, tem sido proposto a suplementação dos meios de cultivo oocitário e embrionário com antioxidantes (10, 11), e a redução da tensão de oxigênio a níveis mais próximos do fisiológico (5%) (5).

ANTIOXIDANTES NO MEIO DE CULTIVO *IN VITRO*

A síntese de GSH nos oócitos e embriões depende da disponibilidade de aminoácidos precursores no meio extracelular e de um sistema de transporte destes aminoácidos pela membrana plasmática (34). Baseado nisso, os meios de cultivo padrão, como TCM199, são normalmente enriquecidos com aminoácidos como cisteína e/ou cistina (35).

Efeitos benéficos da cisteína nos meios MIV e CIV têm sido relatados em bovinos e suínos, no entanto, ainda existe discrepância entre autores com relação aos resultados obtidos (36, 37). Apesar de a cisteína ser diretamente aproveitada pelo oócito e embrião para síntese de glutathiona, sua estabilidade no meio extracelular é muito baixa, sendo oxidada em cistina em uma hora de cultivo (38).

Evidências indicam ainda que tanto oócitos desnudos como embriões não conseguem utilizar a cistina presente no meio de cultivo, provavelmente pela ausência de um sistema de transporte transmembrana de cistina ou pela incapacidade de conversão desta em cisteína (10, 39).

Neste contexto, as células do *cumulus* desempenham importante função, uma vez que, conseguem recuperar a cistina do meio e convertê-la em cisteína. Além disso, sintetizam GSH que juntamente com cisteína são transferidas ao oócito pelas junções GAP (39, 40). Evidências indicam incremento no nível intracelular de GSH quando oócitos desnudos são cultivados na presença de complexos *cumulus*-oócitos intactos (41) ou monocamada de células do *cumulus* (35).

Deste modo, o estoque intraocitário de glutatona está diretamente relacionado à presença do *cumulus* (42), sendo favorecido pela íntima comunicação destas células com o oócito pelas junções GAP.

Neste contexto, a adição de compostos tióis de baixo peso molecular como a cisteamina e o β -mercaptoetanol aos meios de cultivo *in vitro* suplementados com cistina e/ou cisteína consiste numa alternativa para incrementar a concentração intracelular de GSH. Evidências indicam que tal estratégia resulta em maior eficiência da PIV (3, 43).

Os compostos tióis têm a capacidade de converter a cistina em cisteína, que é diretamente aproveitada tanto pelos oócitos como embriões. Além disso, impedem a oxidação da cisteína, aumentando a sua disponibilidade no meio extra e intracelular. Como consequência, há incremento da síntese de GSH resultando em maior viabilidade oocitária e embrionária (44, 45).

Estudos relatam ainda maiores taxas de blastocistos e redução da apoptose, em diferentes espécies animais, quando os meios MIV e CIV foram suplementados com cisteamina e/ou beta-mercaptoetanol associados à cistina e/ou cisteína (34, 43, 44, 46). 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 (3).

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 EROs são fundamentais para hiperativação, capacitação e reação acrossômica dos espermatozoides (31).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme exposto, as condições de cultivo *in vitro* favorecem o estresse oxidativo que interfere negativamente na PIV. Modificações nestas condições, como suplementação dos meios de cultivo com compostos tióis e baixas concentrações de oxigênio tem sido propostas como alternativas para aumentar a viabilidade dos oócitos e embriões. Apesar dos resultados satisfatórios obtidos, acredita-se que o estudo aprofundado dos aspectos bioquímicos e moleculares do fluido folicular e do ambiente uterino é imprescindível para reprodução de condições de cultivo *in vitro* semelhantes ao fisiológico, resultando em melhor eficiência de biotecnologias reprodutivas como a PIV.

REFERÊNCIAS

1. Ward F, Enright B, Rizos D, Boland M, Lonergan P. Optimization of *in vitro* bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology*. 2002;57:2105-17.
2. Zicarelli L, Donnay I, De Rosa A, Boccia L, Monaco E, Attanasio L, et al. Use of thiol compounds during *in vitro* maturation of buffalo oocytes: effects on embryo development. *Ital J Anim Sci*. 2005;4:304-6.
3. Choe C, Shin YW, Kim EJ, Cho SR, Kim HJ, Choi SH, et al. Synergistic effects of glutathione and β -mercaptoethanol treatment during *in vitro* maturation of porcine oocytes on early embryonic development in a culture system supplemented with L-cysteine. *J Reprod Dev*. 2010;56:575-82.
4. Krisher RL. The effect of oocyte quality on development. *J Anim Sci*. 2004;82:E14-E23.

5. Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A, Watanabe T. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology*. 2004; 62:1186-97.
6. Wang X, Falcone T, Attaran M, Goldberg JM, Agarwal A, Sharma RK. Vitamin C and Vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. *Fertil Steril*. 2002;78:1272-7.
7. Livingston T, Rich K, Mackenzie S, Godkin JD. Glutathione content and antioxidant enzyme expression of *in vivo* matured sheep oocytes. *Anim Reprod Sci*. 2009;116:265-73.
8. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005;3:1-21.
9. Guérin P, El Mouatassim S, Ménézo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update*. 2001;7:175-89.
10. De Matos DG, Gasparrini B, Pasqualini SR, Thompson JG. Effect of glutathione stimulation during *in vitro* maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology*. 2002;57:1443-51.
11. Urdaneta A, Jiménez AR, Paramio M, Izquierdo D. Cysteamine, glutathione and ionomycin treatments improve *in vitro* fertilization of prepubertal goat oocytes. *Zygote*. 2004;12:277-84.
12. Luberda Z. The role of glutathione in mammalian gametes. *Reprod Biol*. 2005;5:5-17.
13. Wu G, Fang Y, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr*. 2004;134:489-92.
14. Agarwal A, Gupta S, Sekhon L, Shah R. Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10:1375-403.
15. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Assoc Med Bras*. 1997;43:1-16.
16. Gate L, Paul J, Ba GN, Tew KD, Tapiero H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed Pharmacother*. 1999;53:169-80.
17. Schneider CD, Oliveira AR. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev Bras Med Esporte*. 2004;10:308-13.
18. Nordberg J, Arnér ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*. 2001;31:1287-312.
19. Lima ES, Abdalla DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Rev Bras Cienc Farm*. 2001;37:293-303.

20. McBride JM, Kraemer WJ. Free radicals, exercise and antioxidantes. J Strength Cond Res. 1999;13:175-83.
21. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radical in biology and medicine. 3^a ed. New York: Oxford Science Press; 1999.
22. Mello Filho AC, Hoffman ME, Meneghini R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. Biochem J. 1983;218:273-5.
23. Hershko C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. Semin Hematol. 1989;26:277-85.
24. Nasr-Esfahani MH, Aitken JR, Johnson MH. Hydrogen peroxide levels in mouse oocyte and early cleavage stages embryos developed in vitro or in vivo. Development. 1990;109:501-7.
25. Chatterjee S, Gagnon C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. Mol Reprod Dev. 2001;59:451-8.
26. Sies H. Strategies of antioxidant defense - review. Eur J Biochem. 1993;215:213-9.
27. Meister A, Anderson ME. Glutathione. Ann Rev Biochem. 1983;52:711-60.
28. Hall AG. The role of glutathione in the regulation of apoptosis. Eur J Clin Invest. 1999;29:238-45.
29. Zuelke KA, Jeffay SC, Zucker RM, Perreault SD. Glutathione (GSH) concentration vary with the cell cycle in maturing hamster oocytes, zygotes, and preimplantation stage embryos. Mol Reprod Dev. 2003;64:106-12.
30. De Matos DG, Furnus CC. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development: effect of B-mercaptoethanol, cysteine and cystine. Theriogenology. 2000;53:761-71.
31. Stradaoli G, Noro T, Sylla L, Monaci M. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. Theriogenology. 2007;67:1249-55.
32. Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Prather RS, Day BN. Presence of b-mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured in vitro and the rate of blastocyst development after in vitro fertilization. Theriogenology. 1998;50:747-56.
33. Lapointe J, Bilodeau JF. Antioxidant defenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle. Biol Reprod. 2003;68:1157-64.
34. Gasparrini B, Boccia L, Marchandise J, Di Palo R, George F, Donnay I, 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. 2006;65:275-87.

35. De Matos DG, Furnus CC, Moses DF. Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. *Biol Reprod.* 1997;57:1420-5.
36. Ali AA, Bilodeau JF, Sirard MA. Antioxidant requirement for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. *Theriogenology.* 2003;59:939-49.
37. Katayama M, Reike A, Cantley T, Murphy C, Dowell L, Sutovsky P, et al. Improved fertilization and embryo development resulting in birth of live piglets after intracytoplasmic sperm injection and in vitro culture in a cysteine-supplemented medium. *Theriogenology.* 2007;67:835-47.
38. Kobayashi M, Asakuma S, Fukui Y. Blastocyst production by in vitro maturation and development of porcine oocytes in defined media following intracytoplasmic sperm injection. *Zygote.* 2007;15:93-102.
39. Nagai T. The improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology.* 2001;55:1291-301.
40. Ka HH, Sawai K, Wang WH, Im KS, Niwa K. Amino acids in maturation medium and presence of cumulus cells at fertilization promote male pronuclear formation in porcine oocytes matures and penetrated in vitro. *Biol Reprod.* 1997;57:1478-83.
41. Luciano AM, Lodde V, Beretta MS, Colleoni S, Lauria A, Modena S. Developmental capability of denuded bovine oocyte in co-culturesystem with intact cumulus–oocyte complexes: role of cumulus cells,cyclic adenosine 30,50-monophosphate, and glutathione. *Mol Reprod Dev.* 2005;71:389-97.
42. Tatemoto H, Sakurai N, Muto N. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during In vitro maturation: role of cumulus cells. *Biol Reprod.* 2000;63:805-10.
43. Kobayashi M, Lee ES, Fukui Y. Cysteamine or bmercaptoethanol added to a defined maturation medium improves blastocyst formation of porcine oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology.* 2006;65:1191-9.
44. Takahashi M, Nagai T, Okamura N, Takahashi H, Okano A. Promoting effect of beta-mercaptoethanol on in vitro development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos. *Biol Reprod.* 2002;66:562-7.
45. Zhou P, Wu YG, Li Q, Lan GC, Wang G, Gao D, et al. The interactions between cysteamine, cystine and cumulus cells increase the intracellular glutathione level and developmental capacity of goat cumulus-denuded oocytes. *Reproduction.* 2008;135:605-11.
46. Rodriguez-Gonzalez E, Lopez-Bejar M, Mertens MJ, Paramio MT . Effects on in vitro embryo development and intracellular glutathione content of the presence of thiol compounds during maturation of prepubertal goat oocytes. *Mol Reprod Dev.* 2003;65:446-53.

Recebido em: 16/01/12

Aceito em: 20/08/12