



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOMEDICINA

VANESSA CUNHA DE BRITO

**EFEITO DA CISTEAMINA E β -MERCAPTOETANOL NO CULTIVO *IN VITRO* DE
EMBRIÕES BUBALINOS**

Orientador: Otávio Mitio Ohashi

Belém

2017

VANESSA CUNHA DE BRITO

**EFEITO DA CISTEAMINA E β -MERCAPTOETANOL NO CULTIVO *IN VITRO* DE
EMBRIÕES BUBALINOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Biomedicina da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Dr. Otávio Mitio Ohashi

Belém

2017

VANESSA CUNHA DE BRITO

EFEITO DA CISTEAMINA E β -MERCAPTOETANOL NO CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BUBALINOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Biomedicina da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina, aprovado com o conceito

Belém (PA), 24 de fevereiro de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: _____
Prof. Dr. Otávio Mitio Ohashi – UFPA

Avaliador 1: _____
Prof. Dr. Thiago Velasco Guimarães – UFPA

Avaliador 2: _____
Prof^a. Dr^a Marcela da Silva Cordeiro – IFPA

Suplente: _____
Prof^a. Dr^a Nathalia Nogueira da Costa – UFPA

“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro”.
(Albert Einstein)

DEDICATÓRIA

“A meus pais Wilson e Virgínia, por todo amor e compreensão, e por não medirem esforços para estarem ao meu lado.”

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre me guiar nos melhores caminhos e me dar força nos momentos de fraqueza;

Aos meus pais, Wilson Brito e Virgínia Brito, por não medirem esforços para minha educação e formação profissional e pessoal, me aconselhando e apoiando em todas minhas decisões. À minha irmã, Valéria Brito, pelas brigas, incentivo e amizade;

Ao meu orientador Otávio Mitio Ohashi pela confiança depositada em mim e oportunidade de ser parte da equipe e projetos do Laboratório de Fecundação *in vitro* da UFPA, mas principalmente pelos ensinamentos sobre a vida e por inspirar em mim a aptidão científica e a paixão pelos búfalos.

À Nathalia Nogueira que sempre gentilmente me auxiliou desde o início do estágio principalmente na escrita com maravilhosas ideias e conselhos;

Ao Eduardo Baia que sempre esteve disposta a ajudar durante os experimentos seja com coletas de ovário, durante os procedimentos de PIVE ou ideias que acrescentaram em muito meu trabalho;

Aos meus amigos do Laboratório de Fecundação *in vitro* da UFPA, Prof^a Simone, Thiago, Marcielly, Andrey, Ana Júlia, Jéssica, Moisés, Arnaldo pela paciência e companheirismo de todos os dias;

As “Gordianes”, Ana Carolina, Aline, Camily, Higo e Jackson que nas horas mais difíceis tornaram tudo mais leve, amizade verdadeira e companheira que vou levar pra toda vida;

Aos amigos do Setor de Reprodução animal da UFRA, Prof^o Sebastião Rolim pelas conversas e ensinamentos e Anelise Sarges pela amizade e por não medir esforços pra me ajudar sempre;

Ao Setor de Reprodução animal da UFRA, onde foi coletado o sêmen utilizado durante todo o procedimento;

A empresa BUBRAS por ceder os animais para coleta do sêmen utilizado durante todo o procedimento, em especial ao Dr. Henry Manrique pelo apoio;

Ao abatedouro frigorífico SOCIPE, em especial ao Rodrigo pelo auxílio na coleta dos ovários e atenção para que eu não perdesse nenhum ovário de búfala;

Ao CNPQ, pela concessão da bolsa de estudos;

A Universidade Federal do Pará, Faculdade de Biomedicina.

RESUMO

BRITO, V. C. **Efeito da adição de cisteamina e β -mercaptoetanol no cultivo *in vitro* de embriões bubalinos**. 2017. folhas 33 f. Monografia (TCC em Biomedicina) – Coordenadoria do Curso de Biomedicina, Instituto Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Pará, 2017.

A eficiência da produção *in vitro* de embriões está associada a diversos fatores que dependem tanto dos oócitos quanto dos sistemas de cultivo dos embriões. Condições subótimas de cultivo podem representar uma das principais razões para as baixas taxas de PIVE em bubalinos e um dos principais fatores que podem acarretar a redução da eficiência dos sistemas de cultivo oocitário e embrionário *in vitro* é o estresse oxidativo. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da cisteamina (25 μ M e 50 μ M), no cultivo *in vitro* de embriões bubalinos. Para a produção *in vitro* os ovários bubalinos foram obtidos de abatedouro e no laboratório, posteriormente os CCOs foram selecionados e fecundados 20 horas após a maturação. Aproximadamente 24 horas após a FIV, os prováveis zigotos foram transferidos para gotas com meio de SOF (“Synthetic fluid oviduct”) de acordo com os seguintes grupos experimentais: **Grupo controle** (meio SOF sem a adição de nenhum agente antioxidante); **Grupo β -ME** (meio SOF acrescido de 50 μ M de β -mercaptoetanol); **Grupo Cys 25** (meio SOF acrescido de 25 μ M de cisteamina); **Grupo Cys 50** (meio SOF acrescido de 50 μ M de cisteamina). Os embriões foram cultivados durante seis dias com análise da clivagem no 2º dia, taxa de blastocisto e número total de células embrionárias no 6º dia. As taxas de desenvolvimento embrionário e qualidade embrionária foram analisadas pelo ANOVA e a através do programa Bio Estat 5.0 com nível de significância de 5%. Não houve diferença significativa com relação às taxas de Blastocisto, Clivagem e Blastocistos/Clivados no sexto dia entre o Grupo Controle e os demais grupos experimentais e nem destes entre si. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) em relação à avaliação qualitativa do número total de células, entre os grupos 25 μ M de cisteamina ($267,5 \pm 39,9$) e β -mercaptoetanol ($173,25 \pm 60,5$), tendo o primeiro apresentando maior número de células em média que o segundo, mostrando a qualidade superior dos embriões cultivados com 25 μ M de cisteamina. Nossos resultados sugerem que a melhor concentração de cisteamina a ser adicionada nos meios de cultivo de embrião bubalino é 25 μ M. E ainda, o uso de cisteamina como antioxidante no sistema de cultivo *in vitro* embrião é a melhor alternativa quando comparado com o uso do β -mercaptoetanol em relação à qualidade embrionária.

Palavras-chave: Cisteamina; β -mercaptoetanol; bubalinocultura; produção *in vitro* de embriões.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BSA:** Albumina Sérica Bovina
CAT: Catalase
CCO's: Complexos cumulus oophorus
CIV: Cultivo *in vitro*
Cys: Cisteamina
ERO's: Espécies reativas de oxigênio
FIV: Fecundação *in vitro*
GPX: Glutathione peroxidase
GSH: Glutathione
H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
MIV: Maturação *in vitro*
PIVE: Produção *in vitro* de embriões
SFB: Soro Fetal Bovino
SOD: Superóxido dismutase
SOF: Synthetic fluid oviduct
β-ME: β-mercaptoetanol

Sumário

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Importância da bubalinocultura	1
1.2 Produção in vitro de embriões bubalinos	2
1.4 Uso de antioxidantes nos meios de PIVE.....	5
1.5 Cisteamina.....	6
2 OBJETIVOS	8
2.1 Objetivo geral.....	8
2.2 Objetivo específico.....	8
3 MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1 Delineamento experimental	9
3.2 Produção in vitro de embriões.....	9
3.2.1 Coleta de Ovários e Punção Folicular	9
3.2.2 Rastreamento e Seleção dos Complexos-Cumulus-Oócito (COC)	9
3.2.3 Maturação in vitro (MIV)	10
3.2.4 Fertilização in vitro (FIV)	10
3.2.5 Cultivo in vitro (CIV)	11
3.3 Análise quantitativa e qualitativa do desenvolvimento embrionário	11
3.4 Análise Estatística.....	12
4.1 Análise quantitativa do desenvolvimento embrionário.....	13
4.2 Análise qualitativa do desenvolvimento embrionário	15
6 CONCLUSÕES.....	18
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

1 INTRODUÇÃO

1.1 Importância da bubalinocultura

De acordo com os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) no ano de 2013, dentre os animais de grande porte, o efetivo de bubalinos foi aquele que apresentou a maior variação positiva comparativamente a 2012, com aumento de 5,6%. O efetivo brasileiro de bubalinos foi de 1,332 milhão de cabeças em 2013. A maior concentração desse plantel ocorria na Região Norte, onde 66,1% do efetivo encontravam-se mais especificamente em dois estados, Pará e Amapá, que, em conjunto, detinham 58,3% do efetivo nacional dessa espécie. Na sequência, apresentava-se o Estado do Amazonas, com 6,4% de participação.

Nesse contexto, o desenvolvimento e a utilização das biotécnicas da reprodução animal como a congelamento de sêmen, a inseminação artificial, a transferência de embriões e a produção *in vitro* de embriões, surgem como eixo central para aumentar a capacidade de multiplicação de material genético superior e promover o melhoramento animal, sendo que a PIVE destaca-se pelo fato de ser cada vez mais difundida e utilizada comercialmente em vários países (GOBELLO, 2004; OHASHI *et al.*, 2006).

Já o rebanho bovino brasileiro em 2015 atingiu o recorde de 215,20 milhões de cabeças, representando um aumento de 1,3% em relação a 2014. O Brasil possui o maior rebanho comercial de gado bovino do mundo, com 214 milhões de cabeças, tendo exportado em 2015 o equivalente a US\$ 5,9 bilhões. Nos últimos anos, é possível observar um deslocamento da produção de bovinos para o Norte do País, o que se deve, em parte, aos baixos preços das terras, disponibilidade hídrica, clima favorável, incentivos governamentais e abertura de grandes plantas frigoríficas (IBGE, 2015).

Para a criação desse rebanho foi preciso a implantação de grandes áreas de pastagens, formada em grande parte pela derrubada e queimada da floresta provocando dano e poluição ambiental devido ao modelo de produção animal que é o manejo extensivo das pastagens, caracterizada pela baixíssima produtividade, que no caso da região norte é de cerca de 0,4 a 0,7 animal por hectare de pastagem (DIEESE, 2011). Só entre agosto de 2015 e julho de 2016, a taxa de desmatamento da área florestal na Amazônia, levantada pelo Projeto de Monitoramento do Desmatamento na Amazônia Legal por Satélite (PRODES), do Instituto

Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), foi de 7.989 km², com um aumento de 29% em relação ao mesmo período do ano anterior (INPE, 2016).

Entretanto, existem cerca de 25 milhões de hectares de pastagem nativa em terras inundáveis (várzea) de alta fertilidade, com limitações para a pecuária bovina, em função da inundação das mesmas no período chuvoso, mas propícia para a bubalina (EMBRAPA, 2012). Isto demonstra o potencial que ainda pode ser explorado pela pecuária bubalina regional, tendo em vista a sua pequena população em relação a grande área de pastagem nativa de várzea, evitando com isso a derrubada de novas áreas da floresta para a formação de pastagem, diminuindo, portanto o impacto ambiental da atividade pecuária na Amazônia, ao mesmo tempo em que promove a inclusão de áreas de baixo potencial econômico, dentro da cadeia da produção pecuária, promovendo o desenvolvimento econômico regional com baixo impacto sobre o meio ambiente.

Além disso, a espécie bubalina é uma alternativa de produção pecuária para a Amazônia em função do menor impacto ambiental, a mesma tem despertado interesse crescente nos pecuaristas na América Latina por sua comprovada produtividade. Contudo, para alcançar mercados exigentes, os produtores de bubalinos necessitam elevar o padrão genético de seus rebanhos, a fim de ofertar carne e leite de qualidade, a preços competitivos (OHASHI et al., 2003).

1.2 Produção *in vitro* de embriões bubalinos

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) possui grande potencial para o desenvolvimento da bubalinocultura, assim como ocorre na espécie bovina visto que em 2014 o Brasil foi considerado o maior produtor mundial de embriões com 366.517 unidades produzidas por ano, cerca de 70% do total mundial (IETS, 2014). Apesar dos avanços na técnica, os resultados obtidos em termos produtivos e reprodutivos em bubalinos ainda estão muito aquém daqueles encontrados em bovinos (FERRAZ, *et al.*, 2015). Nos programas de transferência de embriões produzidos *in vitro*, os índices de produção embrionária e a qualidade dos embriões têm fundamental importância para a difusão e sucesso da técnica. Como a PIVE vem sendo aplicada extensivamente na espécie bubalina, um expressivo número de embriões tem sido destinado para pesquisa e também para o manejo comercial em bubalinos (NANDI *et al.* 2002; ELAMARAN *et al.* 2012).

Entretanto, embora a PIVE possa ser realizada com algum sucesso em bubalinos, apresentando taxas de maturação (80%), Clivagem (50%) e formação de Blastocisto (20%) (OBA E CAMARGOS, 2011) e inclusive com relato de nascimento de animais clonados (SAHA et al. 2013), nestes animais esta técnica ainda apresenta baixas taxas de produção de blastocistos e nascidos após a transferência dos embriões (FERRAZ, *et al.*, 2015).

Ainda, em análise morfológica comparativo de oócitos e embriões de búfalos foram observados abundantes grânulos citoplasmáticos caracterizados por conteúdo lipídico elevado, proporcionando aspecto escuro sob a luz do estereomicroscópio (BONI *et al.*, 1996). Essas observações sugerem que os oócitos e embriões desta espécie parecem ser mais sensíveis ao estresse oxidativo que os demais mamíferos (GASPARRINI *et al.*, 2002). Essa situação inviabiliza a utilização desta biotecnologia em larga escala, e dentre os fatores apontados para justificar as baixas taxas de embriões produzidos em búfalas estão o efeito da sazonalidade (DI FRANCESCO *et al.* 2012), a qualidade e quantidade de oócitos bubalinos recuperados e remetidos para PIVE (NANDI *et al.* 2002), e as condições subótimas de cultivo (ELAMARAN *et al.* 2012).

Diante deste cenário, alguns estudos pioneiros demonstraram que o cultivo *in vitro* de embriões sob baixas concentrações de oxigênio (O₂) possibilita uma menor produção de radicais livres do que em ambientes com altas concentrações, pois sabe-se que a concentração de oxigênio no trato reprodutivo das fêmeas é 1/3 (3 a 9% de O₂) da que é encontrada na maioria dos sistemas de PIVE (20% de O₂) (MASTROIANNI E JONES, 1965). Além disso, a necessidade de desenvolvimento de meios de maturação e sistemas de cultivo mais eficientes para melhoria da produção embrionária, específicos para búfalos, se torna cada vez mais pertinente (GASPARRINI *et al.* 2007). Por conseguinte, a suplementação do meio de maturação com diferentes substâncias, como fatores de crescimento em meios livre de soro fetal bovino (PUROHIT *et al.* 2005) e principalmente antioxidantes, como a cisteamina e o β -mercaptoetanol (ANAND *et al.* 2008; SINGHAL *et al.* 2009) tem se tornado objeto de estudo de diversos pesquisadores visando melhorar a eficiência do processo e definir condições ideais para PIVE em bubalinos.

1.3 Espécies reativas de oxigênio (ERO's)

Os átomos contêm um núcleo onde seus elétrons se distribuem ao redor, usualmente, em pares. É muito importante para a célula que a molécula de oxigênio (O₂) aceitando quatro elétrons seja completamente reduzida a duas moléculas de água (H₂O). Se o O₂ é parcialmente reduzido pela recepção de somente dois elétrons, o produto desta redução será o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Se o O₂ receber somente um elétron, o produto será o radical superóxido (O₂⁻) (GATE *et al.*, 1999; PEREIRA, 2015).

O radical livre, portanto, pode ser definido como sendo um átomo ou molécula que contém um ou mais elétrons não pareados. A presença de elétrons não pareados altera a reatividade química dos átomos ou moléculas, tornando-os mais reativos que as espécies não radicalares (com elétrons pareados). O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o superóxido (O₂⁻) são extremamente tóxicos para as células porque atacam os ácidos graxos insaturados que são componentes da bicamada lipídica da membrana, provocando lesão celular (VANNUCCHI *et al.*, 1998; PEREIRA, 2015).

No entanto, os organismos eucarióticos possuem em suas células vários sistemas de defesa ao estresse oxidativo compostos por alguns nutrientes (vitamina E, β-caroteno) e, principalmente, por antioxidantes não enzimáticos como a glutathiona (GSH), o ácido úrico, licopeno, bilirrubina e antioxidantes enzimáticos como a catalase (CAT), a glutathiona peroxidase (GPX) e o superóxido dismutase (SOD) dentre outros que irão proteger reparar e prevenir o acúmulo de moléculas alteradas por oxidação (GASPARRINI *et al.*, 2003; DREVET, 2006). Esses mecanismos chamados de sistemas antioxidantes são capazes de prevenir os danos que estas espécies reativas de oxigênio poderiam oferecer à célula. O distúrbio no balanço entre pró-oxidantes e antioxidantes em favor da formação de radicais livres causa danos celulares, fenômeno este chamado de dano oxidativo ou estresse oxidativo (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999; PEREIRA, 2015).

1.4 Uso de antioxidantes nos meios de PIVE

Assim, a eficiência da produção *in vitro* de embriões está associada a diversos fatores que dependem tanto dos oócitos, quanto dos sistemas de cultivo dos embriões. Condições sub ótimas de cultivo podem representar uma das principais razões para as baixas taxas de PIVE em bubalinos (ELAMARAN *et al.* 2012) e um dos principais fatores que podem acarretar a redução da eficiência dos sistemas de cultivo oocitário e embrionário *in vitro* é o estresse oxidativo .

Ao trabalhar com sistemas de produção de embriões, nas quais os oócitos e embriões são submetidos à condições *in vitro*, a produção de ERO's é altamente acentuada. Isto porque situações de alta tensão de oxigênio, manipulação excessiva, exposição a fontes de luz e calor, presença de espermatozoides e ausência da proteção antioxidante materna, comumente encontrada nos cultivos *in vitro*, favorecem a produção das ERO's (GUERIN *et al.* 2001).

Diante deste entrave, duas principais alternativas têm sido propostas para amenizar o efeito do estresse oxidativo na PIVE. Uma se refere à diminuição da tensão de oxigênio utilizada nos cultivos de oócitos e embriões. Assim, a atmosfera gasosa de sistemas de cultivo passaria a ter 5% de O₂, ao invés dos 20% normalmente utilizados. Com a redução da porcentagem de O₂, aumentou-se a taxa de blastocistos produzidos *in vitro* em suínos (KITAGAWA *et al.* 2004), ovinos (THOMPSON *et al.* 1990) e bovinos (CORREA *et al.* 2008) assim como a qualidade dos embriões. Outra alternativa encontrada é a adição de substâncias antioxidantes nos meios de maturação e cultivo. Uma vez adicionados aos meios, estes compostos contribuem para eliminação das ERO's levando ao aumento na produção de blastocistos tanto em bovinos (DE MATOS *et al.* 2002) quanto em bubalinos (ANAND *et al.* 2008).

Neste contexto, a suplementação dos meios de maturação e cultivo *in vitro* com agentes antioxidantes tem sido utilizada na tentativa de reduzir as perdas decorrentes ao estresse oxidativo. Compostos tióis de baixa massa molecular como a cisteamina e o β-mercaptoetanol têm sido associados ao aumento da produção de blastocitos em diversas espécies (ANAND *et al.* 2008). A cisteamina, por exemplo, mostrou um efeito benéfico sobre o meio MIV tanto em bovinos (DE MATOS E FURNUS, 2000) quanto em bubalinos (GASPARRINI *et al.* 2003). Nestes últimos comprovou-se o aumento da produção e eclosão

dos blastocistos (ANAND *et al.* 2008) e redução da apoptose nos embriões (ELAMARAN *et al.* 2012) quando o meio MIV foi suplementado com 50µM de cisteamina.

1.5 Cisteamina

A cisteamina, que é um composto tiol de baixo peso molecular, tem o papel de reduzir a cistina para cisteína e aumentar a síntese de GSH (glutathiona) nas células, principalmente nos oócitos, aumentando a quantidade de GSH disponível no meio e protegendo as células contra as espécies reativas de oxigênio (ERO'S) (ISSELS *et al.* 1988; MUKHERJEE *et al.* 2010).

A Glutathiona é um tripeptídeo tiol e também o maior componente sulfidrílico não-protéico em células de mamífero, atua como antioxidante natural presente em ambos os gametas e tem papel importante na proteção contra os efeitos prejudiciais das espécies reativas de oxigênio (ERO'S) (figura1) e na regulação da síntese de proteínas e DNA pela alteração do *status* de redução- oxidação (DE MATOS E FURNUS, 2000). A síntese de GSH é altamente dependente da disponibilidade de cisteína no meio de cultivo (DE MATOS *et al.*, 1995), entretanto a cisteína no meio é facilmente oxidada, formando a cistina, um dímero cisteínico, mesmo em meios de cultivo estabelecidos para rotina (DE MATOS E FURNUS, 2000). Quando a cisteína é oxidada a cistina, alguns tipos celulares têm dificuldade de usar a cistina, dificultando sua proliferação e aumentando a concentração intracelular de glutathiona (ISHII *et al.* 1981; ELAMARAN *et al.* 2012).

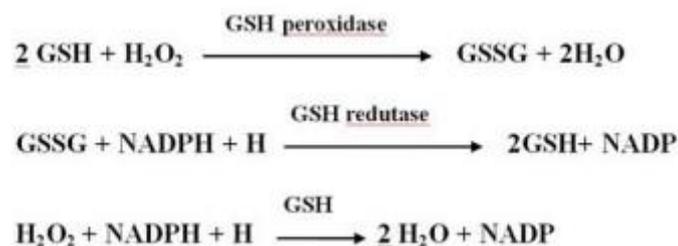


Figura 1. Reações químicas que representam a dismutação do peróxido de hidrogênio pelo sistema glutathiona redutase/ peroxidase (CROCOMO, 2012).

Adição de cisteamina nos meios de maturação aumentaram a síntese de glutathione (GSH) (DE MATOS E FURNUS, 2000), responsável por protegê-las dos efeitos citotóxicos das ERO's e manter o potencial redox intracelular (GASPARRINI *et al.*, 2002). Além do mais, atuando no processo de maturação citoplasmática (GASPARRINI, 2006), a cisteamina promoveu uma melhoria das taxas de maturação oocitária pelo efeito na proteção dos oócitos contra o estresse oxidativo (GASPARRINI *et al.* 2003). Estes achados estão de acordo com Eppig (1996), que demonstrou que o aumento dos níveis de GSH melhora a competência de desenvolvimento dos oócitos após a fertilização e clivagem. Estudos relatam ainda maiores taxas de blastocistos e redução da apoptose, quando os meios MIV e CIV foram suplementados com cisteamina associados à cistina e/ou cisteína em bovinos (TAKAHASHI, 2002), bubalinos (GASPARRINI *et al.*, 2006) e em suínos (KOBAYASHI, 2006). 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, e, portanto a combinação desses fatores poderá aumentar a qualidade e a quantidade dos embriões produzidos *in vitro* com a adição de cisteamina nos meios de cultivo embrionário.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a adição de cisteamina como agente antioxidante na produção in vitro de embriões bubalinos.

2.2 Objetivo específico

- Comparar o uso da cisteamina e β -mercaptoetanol como agentes antioxidantes em bubalinos durante desenvolvimento embrionário;
- Avaliar o uso de cisteamina e β -mercaptoetanol no cultivo de embriões quanto à qualidade embrionária.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

Neste experimento foi avaliada a eficiência da cisteamina como agente antioxidante no cultivo *in vitro* de embriões bubalinos, sendo realizadas três repetições utilizando-se um total de 188 CCO's maturados e posteriormente cultivados, de acordo com os seguintes grupos experimentais: **Grupo Controle** (meio SOF sem a adição de nenhum agente antioxidante, '38 oócitos'); **Grupo β -ME** (meio SOF acrescido de 50 μ M de β -mercaptoetanol '47 oócitos'); **Grupo Cys 25** (meio SOF acrescido de 25 μ M de cisteamina '55 oócitos'); **Grupo Cys 50** (meio SOF acrescido de 50 μ M de cisteamina '48 oócitos'), de acordo com Sigal et al. (2009), com modificações. O desenvolvimento embrionário foi avaliado no 2º dia de cultivo (taxa de clivagem) e no 6º (taxa de blastocisto, morfologia embrionária e cinética do desenvolvimento embrionário). Após a avaliação dos blastocistos, os embriões foram fixados com formol salino e corados com Hoescht 33342 para posterior avaliação da qualidade embrionária através da contagem no número de células.

3.2 Produção *in vitro* de embriões

3.2.1 Coleta de Ovários e Punção Folicular

Para a produção *in vitro* os ovários bubalinos foram obtidos de abatedouro e no laboratório, os folículos ovarianos medindo entre 2 a 8 mm de diâmetro foram puncionados com o auxílio de agulha 40 x 12 acoplada a uma seringa de 10 mL.

3.2.2 Rastreamento e Seleção dos Complexos-Cumulus-Oophorus (COC's)

Os CCOs foram selecionados e classificados de acordo com características morfológicas, como a presença de cumulus oophorus compacto, contendo várias camadas de células e rodeando todo o oócito ou no mínimo 70% dele, ooplasma com granulações finas e aspecto homogêneo segundo Di Francesco *et al.*, (2011). Os CCOs selecionados foram lavados em TCM-199 suplementado com Hepes, antibióticos e 10% de soro fetal bovino (SFB).

3.2.3 Maturação *in vitro* (MIV)

Os CCOs foram lavados e incubados em meio de MIV sem adição de nenhum antioxidante (TCM-199 suplementado com bicarbonato de sódio, 10% SFB, gentamicina, FSH, LH e piruvato). A incubação foi feita em placas de Petri com gotas de 100 µL de meio de MIV sob óleo mineral estéril (10 a 15 oócitos por gota), em estufa de CO₂ a 5%, com 38,5°C de temperatura e atmosfera úmida, durante 20 horas.

3.2.4 Fecundação *in vitro* (FIV)

A FIV iniciará 18 à 20 horas após a etapa da maturação. As palhetas de sêmen foram descongeladas de 35°C à 37°C por 30 segundos e depositado, cautelosamente, sobre 800 µL de gradiente descontínuo de Percoll (400 µL a 45% e 400 µL a 90%). Em seguida, o tubo foi submetido à centrifugação por 7 minutos a 180 g, para remoção do diluidor e separação dos espermatozoides vivos dos mortos. Após o término da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet resultante centrifugado a 180 g novamente, durante 3 minutos, em 800 µL de meio de Talp-FIV (TALP suplementado com 10 µg/mL de Heparina, gentamicina, hipotaurina, epinefrina e BSA) para remoção dos resíduos de Percoll. Após o processo de lavagem a concentração espermática foi calculada com auxílio de câmara de Neubauer e ajustada para uma concentração de 2×10^6 espermatozoides por mL para determinação da

concentração e volume de sêmen a serem utilizados para a fecundação. Então, oócitos e espermatozoides permaneceram co-incubados nas mesmas condições citadas para a MIV por um período de aproximadamente 24 horas.

3.2.5 Cultivo *in vitro* (CIV)

Para dar suporte ao desenvolvimento embrionário foi realizado um sistema de co-cultivo dos embriões com monocamada de células do *cumulus oophorus* que aderiram à placa durante a MIV. Para isso, logo após a FIV, a placa pós MIV teve seu meio substituído por 100µL meio de cultivo embrionário e permaneceu incubada aguardando o momento da transferência dos embriões.

Aproximadamente 24 horas após FIV, os prováveis zigotos foram submetidos à sucessivas pipetagens para retirada das células do *cumulus oophorus* restantes e dos espermatozoides aderidos à zona pelúcida e então transferidos para gotas com meio de SOF (Sintetic Oviductal Fluid suplementado com 10% de SFB, 1mM de glicose, 10µg/mL de insulina, 6mg/mL de BSA, 80µg/mL piruvato e gentamicina) de acordo com os grupos experimentais.

3.3 Análise quantitativa e qualitativa do desenvolvimento embrionário

A avaliação quantitativa do desenvolvimento embrionário foi realizada no segundo dia de cultivo, mediante a contagem das taxas de clivagem e no sexto e sétimo dia de cultivo, através da taxa de formação de blastocisto e cinética do desenvolvimento (blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido), sendo feitas sob observação em estereomicroscópio.

A análise qualitativa foi realizada através da contagem do número total de células. Para isso os embriões eclodidos foram fixados em formol salino, no sexto e sétimo dia de desenvolvimento, para posterior marcação com fluorocromo Hoechst 33342 (10 µg/mL) e observação em microscópio de epifluorescência.

3.4 Análise Estatística

Os dados nas tabelas estão apresentados como médias dos valores \pm desvio padrão de três repetições independentes. Para a análise das diferentes condições experimentais, a análise de variância (ANOVA) e o pós-teste de Tukey foram utilizados, adotando-se o nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Análise quantitativa do desenvolvimento embrionário

Foram realizadas três repetições nas qual foram obtidos 188 COO's fecundados com o sêmen de um único touro.

A avaliação do desenvolvimento embrionário não mostrou diferença significativa ($p>0,05$) com relação às taxas de clivagem, blastocisto e Blastocisto/Clivados entre os grupos experimentais β -ME (Figura 2), Cys 25 (Figura 3) e Cys 50 (figura 4), como representado na Tabela 1. Porém não foi possível constatar a diferença estatística entre o grupo controle e os demais, visto que para esse só foram realizadas duas repetições.

Tabela 1. Média das taxas de clivados/total, blastocistos/total e blastocistos/clivados para os grupos controle, β -mercaptoetanol, 25 μ M, 50 μ M.

Grupos	n	Clivados (%)	Blastocistos (%)	Blastocistos / Clivados (%)
Controle	38	39 \pm 4,2	10,8 \pm 0,35	26,5 \pm 2,1
β -mercaptoetanol	47	45,6 \pm 11,1	18,3 \pm 8,6	45,3 \pm 32,3
25 μ M cisteamina	55	41,6 \pm 12,6	31 \pm 8,5	76,3 \pm 23
50 μ M cisteamina	48	47,6 \pm 4,0	27,8 \pm 7,5	52 \pm 13,1

Média \pm Desvio padrão

n: Total de oócitos.

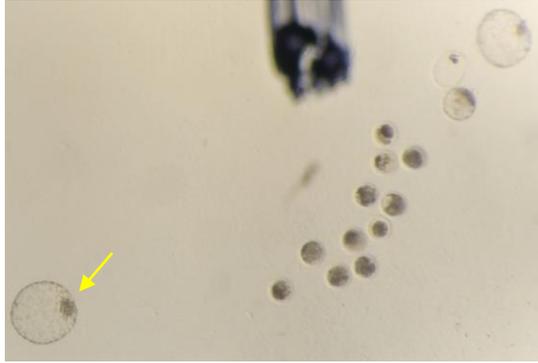


Figura 2. Fotomicrografia de embriões eclodidos cultivados com β -mercaptoetanol (Dia 06). A seta em amarelo destaca a formação do nó embrionário.



Figura 3. Fotomicrografia de embriões eclodidos cultivados com 25 μ M de cisteamina (Dia 06). A seta em amarelo destaca a formação do nó embrionário.



Figura 4. Fotomicrografia de embriões eclodidos cultivados com 50 μ M de cisteamina (Dia 06). A seta em amarelo destaca a formação do nó embrionário.

4.2 Análise qualitativa do desenvolvimento embrionário

Após o cultivo dos embriões, foram utilizados aqueles que alcançaram o estágio de blastocisto eclodido no sexto e sétimo dia de cultivo para a realização da contagem do número total de células, representados pela figura 4.

Houve diferença estatística entre os grupos Cys 25 e β -ME, sendo o número total de células do primeiro superior ao segundo $p < 0,05$ como apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Média do número total de células dos embriões no estágio de blastocisto eclodido no sexto e sétimo dias de cultivo

Grupos	n	Média \pm Desvio padrão
β -mercaptoetanol	06	173,25 \pm 60,5 ^{a,c}
25 μ M cisteamina	15	267,5 \pm 39,9 ^b
50 μ M cisteamina	18	236,75 \pm 31, ^{9b,c}

n: Total de embriões

Sobrescritos diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$);

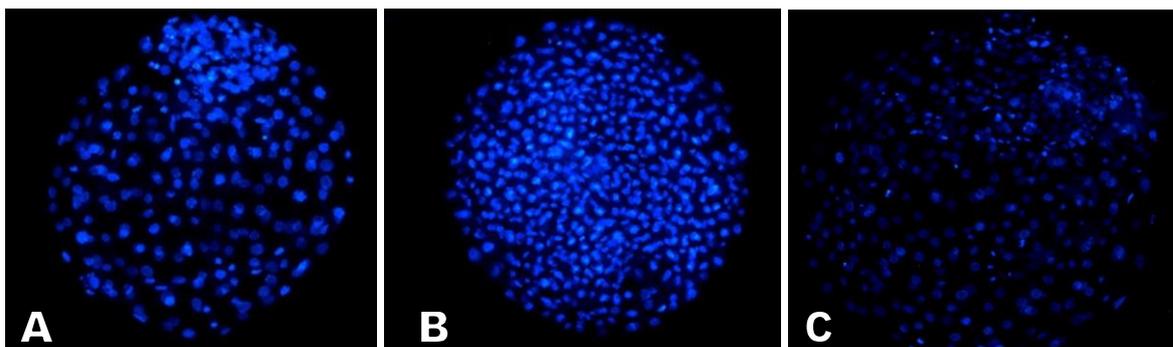


Figura 5. Fotomicrografia dos embriões fixados e corados com Hoechst 33342. A. Embrião cultivado com β -mercaptoetanol. B. Embrião cultivado com 25 μ M de cisteamina. C. Embrião cultivado com 50 μ M de cisteamina.

5 DISCUSSÃO

Este trabalho visou melhorar a produção e qualidade dos embriões produzidos *in vitro* através da adição de compostos que favorecem o aumento de GSH intracelular, promovendo assim proteção antioxidante aos embriões no estágio inicial do desenvolvimento, onde a concentração de GSH intracitoplasmática se encontra mais baixa (GASPARRINI *et al.*, 2000). Assim, no presente estudo foi demonstrado que a presença de cisteamina (25 μ M e 50 μ M) não influenciou estatisticamente na taxa de clivagem e blastocisto em comparação ao β -mercaptoetanol, sendo diferentes apenas na média em relação ao Controle (sem adição de nenhum antioxidante). Porém a concentração de Cys 25 teve uma maior média de células em blastocisto em relação à β -ME sendo estatisticamente significativa ($p < 0,05$), confirmando os resultados de Singhal *et al.* (2009), onde a suplementação de cisteamina aumentou em 25% a taxa de blastocistos sob oócitos obtidos *in vivo*, através da técnica de OVUM PICK UP (OPU).

Os tióis de baixo peso molecular β -E e Cys 25 podem promover a captação de cistina visto que ambos compostos partilham um grupo SH livre como uma estrutura molecular comum e a modificação deste tiol livre por reação química formam uma ponte dissulfeto e a adição de uma nova porção fosfato através da reação com a cistina ao grupo tiol elimina o potencial do composto, e promove a captação da cistina livre no meio (MEIER E ISSELS, 1995). Entretanto, o mecanismo completo pela qual se inicia a reação dos compostos tiol com a cistina, ainda não é completamente conhecido (CHOE *et al.*, 2010).

A suplementação do meio de cultura com 25 Cys e β -ME foi superior em relação às taxas de clivagem e blastocisto quando comparadas à adição de nenhuma, como também relatado anteriormente em bovinos (DE MATOS *et al.*, 2002) e búfalos (ANAND *et al.*, 2008). Isto pode ser devido ao fato de a tensão de O₂ ser um fator regulador importante para o desenvolvimento embrionário *in vitro*, pois geralmente, a tensão de O₂ no ar (20%, 150 mmHg) é maior que a do oviduto (aproximadamente 10%, 40-60 mmHg) (MASTROIANNI E JONES, 1965) e esta tensão elevada de O₂ aumenta a tensão intracelular de O₂ por difusão, induzindo assim a produção excessiva de ERO'S nas células, tendo os compostos antioxidantes um papel fundamental na redução e prevenção da formação desses compostos durante o cultivo *in vitro*, aumentando as taxas de maturação oocitária, clivagem e blastocisto (GASPARRINI *et al.*, 2003).

Também aumentou a qualidade dos embriões produzidos em meio adicionado de cisteamina (25 μ M) corroborando com os resultados de ELAMARAN *et. al.*, 2012, onde a suplementação com cisteamina diminuiu a transcrição de BAX (gene apoptótico) em embriões e também aumentou a quantidade relativa de RNAm dos genes anti-apoptóticos BCL-XL em 4 células, mórula e blastocisto e a do MCL-1 nos estágios de 2, 4, 8 a 16 células e mórula aumentando a qualidade dos embriões produzidos provavelmente diminuindo a produção dos ERO's ou neutralizando após sua produção e assim reduzindo a taxa de células apoptóticas. Isso se deve principalmente porque de acordo com TAKAHASHI *et al.* (2002) compostos tiol de baixo peso molecular como o β -mercaptoetanol e a cisteamina aumentam a viabilidade celular elevando os níveis intracelulares de glutathiona em embriões, o que foi observado quando os embriões foram cultivados na presença de um inibidor da síntese de glutathiona ou com a ausência dos antioxidantes, onde as taxas de blastocisto caíram cerca de 15% a 20%.

Ainda, de acordo com LOJKIC *et. al.* (2012) a suplementação com baixas concentrações de cisteamina foi eficaz em relação à taxa de blastocistos (33%) e proporção da massa celular interna com as células do trofoblasto, em frente a concentrações mais altas onde a taxa de blastocisto foi de (20%). Portanto, altas concentrações de antioxidante podem causar um efeito tóxico durante o cultivo (GASPARRINI *et. al.*, 2000), assim como substâncias instáveis como a cisteína que mesmo em baixa concentração pode se autooxidar facilmente à cistina, comprometendo a síntese de GSH deixando assim de neutralizar os ERO's presentes no meio e até mesmo produzindo metabólitos secundários que podem prejudicar a PIVE (GASPARRINI *et. al.*, 2003; GASPARRINI *et. al.*, 2006).

Em suma, a adição de cisteamina nos meios de cultivo em geral (maturação oocitária e cultivo de embrião) aumenta os níveis de GSH intracelular, sendo importante para a aquisição de competência oocitária a um nível citoplasmático, devido ao acúmulo deste durante a maturação, o que pode superar o problema de uma concentração de GSH intracitoplasmática baixa em embriões no estágio inicial de desenvolvimento, durante o qual os embriões são menos resistentes ao estresse oxidativo, pois os estoques maternos de GSH estão esgotadas e os embriões ainda são incapazes de sintetizar GSH (GASPARRINI *et. al.*, 2000), além elevar o número de células e a massa celular interna (LOJKIC, 2012), reduzir o número de células embrionárias apoptóticas (MUKHERJEE *et. al.*, 2009) e a transcrição de genes apoptóticos (ELAMARAN *et al.*, 2012) em condições *in vitro*, o que provavelmente acarretará no aumento da sua capacidade de sobrevivência e implantação nos programas de

Transferência de embriões em tempo fixo, viabilizando o seu uso comercial na espécie bubalina (SINGHAL, *et. al.* 2009).

Como referido anteriormente, devido ao maior teor de lípidos, oócitos e embriões de búfalo são mais susceptíveis ao estresse oxidativo. Assim, o estresse oxidativo excessivo na PIVE pode ser superado pela redução da formação de ERO'S como consequência do aumento das quantidades de antioxidantes. Melhorar as condições de cultura é um desafio complexo que depende não apenas da escolha de um antioxidante, mas também da sua concentração, do meio e dos seus componentes, das espécies, das mudanças dinâmicas das necessidades específicas do oócito/embrião de acordo com o seu estágio de desenvolvimento. Especulamos que o efeito benéfico no desenvolvimento embrionário exercido pela cisteamina poderia ser mediado por um aumento na síntese de GSH, como foi demonstrado em várias outras espécies. Infelizmente não temos dados para confirmar esta hipótese e outras investigações são necessárias para elucidar o mecanismo pelo qual a cisteamina melhora o desenvolvimento embrionário em espécies de búfalos. Vale ressaltar que a aquisição de mais dados sobre o metabolismo embrionário levará a uma otimização da PIVE em búfalos, a qual não é tão eficiente quando comparada à outras espécies, o que prejudica sua expansão a nível comercial.

6 CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem que a melhor concentração de cisteamina a ser adicionada nos meios de cultivo de embrião bubalino é 25 μ M. E ainda, o uso de cisteamina como antioxidante no sistema de cultivo *in vitro* embrião é a melhor alternativa quando comparado com o uso do β -mercaptoetanol em relação à qualidade embrionária.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANAND, T. et al. Cysteamine supplementation of in vitro maturation medium, in vitro culture medium or both media promotes in vitro development of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v.20, p.253–257, 2008.

BONI, R.; ROVIELLO, S.; ZICARELLI, L. Repeat ovum pick up in Italian Mediterranean buffalo cows. **Theriogenology**, v.46, p.899-909, 1996.

CORREA, G.A. et al. Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. *Animal Reproduction Science*, v. 104, p. 132–142, 2008.

DE MATOS, D. G.; FURNUS, C. C.; MOSES, D. F.; AND BALDASSARRE, H. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, Vol. 42, p. 432–436, 1995.

DE MATOS D. G.; FURNUS, C. C. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development: effect of β -mercaptoethanol, cysteine. **Theriogenology**, v. 53, n. 3, p.761-771, 2000.

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

DI FRANCESCO, S. et al. The effect of season on oocyte quality and developmental competence in Italian Mediterranean buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Animal Reproduction Science**, v.123, p.48–53, 2011.

DI FRANCESCO, S. et al. Ovum pick-up and in vitro embryo production (OPU-IVEP) in Mediterranean Italian buffalo performed in different seasons. **Theriogenology**, v.77, p. 148-145, 2012.

DIEESE - **Departamento Intersindical de Estatística e Estudos Socioeconômicos.** Estatísticas do Meio Rural 2010-2011. 4.ed. São Paulo, 2011.

CHOE, C. 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 cysteine. **Journal of Reproduction and Development**, v. 56, n. 6, 2010.

ELAMARAN, G. et al. Oxygen Concentration and Cysteamine Supplementation During In vitro Production of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Embryos Affect mRNA Expression of BCL-2, BCL-XL, MCL-1, BAX and BID. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, n.6, p.1027-1036, 2012.

EPPIG, J. Coordination of nuclear and cytoplasmic maturation in eutherian mammal. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, p. 485–489, 1996.

FERRAZ, M. L. et al. Paradoxical effects of bovine somatotropin treatment on the ovarian follicular population and in vitro embryo production of lactating buffalo donors submitted to ovum pick-up. **Animal Reproduction Science**, v. 154, p. 1-7, 2015.

GASPARRINI, B.. In vitro embryo production in buffalo species: state of the art. **Theriogenology**, v. 57, n.1, p. 237-256, 2002.

GASPARRINI, B. et al. Glutathione synthesis during in vitro maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effects of cysteamine on embryo development, **Theriogenology**, v. 60, p. 943–952, 2003.

GASPARRINI, B. et al. Enrichment of in vitro maturation medium for buffalo (*Bubalus bubalis*) oocyte with thiol compounds: effect of cysteine on glutathione synthesis and embryo development. **Theriogenology**, v.66, p.275–287, 2006.

GASPARRINI, B. In vitro embryo production in buffalo: current situation and future perspectives. **Italian Journal of Animal Science**, v.6, p.92-101, 2007.

GATE, L. et al. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.53, n.4, p. 169-80, 1999.

GOBELLO, C. **Temas de reproducción de caninos y felinos por autores latinoamericanos**. Ed. Intervet Argentina S.A., 1º ED., Buenos Aires, Argentina, p.107-115, 2004.

GUÉRIN, P.; MOUATASSIM, S. El; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction**. Update. v. 07, n. 02, p. 175-189, 2001.

GUTTERIDGE, J. M. C., HALLIWELL, B. Free radicals in biology and medicine: **Oxford University Press**, Oxford, 1999.

IBGE - **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Produção Pecuária Municipal, Rio de Janeiro, 2015.

IBGE - **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Produção da Pecuária Mundial, Rio de Janeiro, v.41, p.1-63, 2013.

IETS. Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals. **Embryo Transfer Newsletter**, v. 32, p. 14-26, 2014.

INPE - **Instituto Nacional de Pesquisas espaciais**. PRODES estima 7.989 km² de desmatamento por corte raso na Amazônia em 2016, São Paulo, nov. 2016.

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

ISSELS, R. D.; NAGELE, A.; ECKERT, K. G. et al. Promotion of cystine uptake and its utilization for glutathione biosynthesis induced by cysteamine and N-acetylcysteine. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.37, p.881-888, 1988.

KITAGAWA, Y. et al. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. **Theriogenology**, v. 62, p. 1186-1197, 2004.

KOBAYASHI, M.; LEE, E.; FUKUI, Y. Cysteamine or β -mercaptoethanol added to a defined maturation medium improves blastocyst formation. **Theriogenology**, v. 65, p.1191–1199, 2006.

LOJKIC, M. et al. Effect of cysteamine supplementation during in vitro culture of early stage bovine embryos on blastocyst rate and quality. **Acta Veterinaria BRNO**, v81, p. 229–234, 2012.

LOURENÇO, J. B. J.; GARCIA, A. R. Produção animal no bioma Amazônico: atualidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 63-83, 2006.

MASTROIANNI, L.; JONES, R. Oxygen tension within the rabbit fallopian tube. **Reproduction, Fertility and Development**, v.9, p. 99, 1965.

MEIER, T.; ISSELS, R. Promotion of cysteine uptake. **Methods in Enzymology**, v.252, p. 103–112, 1995.

MUKHERJEE, A. Assessment of DNA Damage during In Vitro Development of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Embryos: Effect of Cysteamine. **Reproduction in animals domestics**. V. 45, p. 1118–1121, 2010.

NANDI, S. et al. Production of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Embryos in vitro: Premises and Promises. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, p. 65-74, 2002

OBA, E.; CAMARGOS, A.S. Produção in vitro de embriões bubalinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.2, p.80-87, 2011.

OHASHI, O.M.; et al. Produção in vitro de embrião bubalino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.2, 2003.

OHASHI, O.M.; CORDEIRO, M.S.; MIRANDA, M.S. Biotecnologia da Reprodução Aplicada a Bubalino. **Revista de Ciência Agrária**, n.45, 2006.

PEREIRA, E.C.M. **Produção de oócitos e embriões bubalinos: efeitos da época do ano e da adição de óleo essencial de *lippia origanoides* na maturação *in vitro***. Botucatu, SP. Originalmente apresentada como tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 2015.

PUROHIT, G.N.; BRADY, M.S.; SHARMA, S.S. Influence of epidermal growth factor and insulin-like growth factor 1 on nuclear maturation and fertilization of buffalo cumulus oocyte complexes in serum free media and their subsequent development in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 87, p. 229-239, 2005.

SAHA, A. et al. Birth of cloned calves from vitrified–warmed zona-free buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos produced by hand-made cloning. **Reprod. Reproduction, Fertility and Development**, v.25, p.860– 865, 2013.

SINGHAL, S. et al. Effect of including growth factors and antioxidants in maturation medium used for in vitro culture of buffalo oocytes recovered in vivo. **Animal Reproduction Science**, v. 113, p. 44-50, 2009.

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.

THOMPSON, J.G. et al. Effect of oxygen concentration on in-vitro development of pre implantation sheep and cattle embryos. **Reproduction**, v. 89, p. 573– 578, 1990.

TOWNSEND, C. R.; COSTA N. L.; ARAÚJO, R. G. Pastagens nativas na Amazônia brasileira. Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO, 25 p., n. 149, 2012.

VANNUCCHI, H. et al. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 31, p. 31-44, 1998.