



Implicações do estresse oxidativo no ovário e no embrião mamífero⁽¹⁾

(Implications of oxidative stress in the mammalian ovary and embryo)

"Revisão/Review"

IB Lima-Verde^A, JB Bruno^B, MHT Matos^B, APR Rodrigues^B,
JR Figueiredo^B, MAL Oliveira^A, PF Lima^{A(*)}

^ALaboratório de Biotécnicas Aplicadas à Reprodução do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE. Av. Dom Manoel de Medeiros, Dois Irmãos, 52171 900 Recife-PE - Brasil

^BLaboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará. Av. Paranjana, 1700, Campus do Itapery, 60740 000 Fortaleza-CE, Brasil

Resumo

As espécies reativas de oxigênio (EROs) ou de nitrogênio (ERN) ou radicais livres são produtos do metabolismo orgânico normal e seu acúmulo pode gerar o estresse oxidativo. Este, por sua vez, causa injúrias celulares podendo levá-las à morte, estando este processo envolvido com a degeneração e/ou apoptose celular durante o desenvolvimento embrionário e em diferentes órgãos, como o ovário mamífero. No ovário de camundongas são produzidas EROs durante a regressão luteal que estão envolvidas no processo de ativação folicular e retomada espontânea da meiose em oócitos. Embora sejam produzidos durante processos fisiológicos, o acúmulo de radicais livres no ovário mamífero pode desencadear patologias. No embrião, os radicais livres são produzidos normalmente devido ao metabolismo normal. Porém, em ambientes *in vitro* com altas concentrações de oxigênio, o desenvolvimento do embrião pode ser prejudicado. O óxido nítrico é considerado um radical livre e participa de processos patológicos e fisiológicos como inflamação, ovulação, implantação embrionária e contração uterina. Para proteger os sistemas biológicos dos danos celulares causados pelos radicais livres, o organismo utiliza enzimas como catalase, superóxido-dismutase e glutatona peroxidase, e mecanismos que incluem substâncias antioxidantes tais como vitamina C, vitamina E, β -caroteno dentre outras.

Palavras-chave: radicais livres, antioxidantes, ovário, embrião

Abstract

Reactive oxygen (ROS) or nitrogen (RNS) species or free radicals are products of normal organic metabolism and their accumulation can generate the oxidative stress. Then, this stress causes cellular damage, leading to death. This process is involved with cellular degeneration and/or apoptosis during embryos development and in different organs, such as the mammalian ovary. In murine ovary, ROS are produced during luteal regression and they are involved in the process of follicular activation and spontaneous meiosis resumption in oocytes. Although these are physiological processes, accumulation of free radicals in the mammalian ovary may unchain pathologies. In the embryo, free radicals are normally produced due to normal metabolism. However, in *in vitro* environment with high oxygen concentrations, embryo development can be damaged. Nitric oxide is considered a free radical and takes part in pathologic and physiologic processes, such as inflammation, ovulation, embryo implantation and uterine contraction. To protect the biological systems from cellular damage caused by free radicals, the organism uses enzymatic mechanism, which involves, for instance, catalase, superoxide-dismutase and glutatone peroxidase and others that include antioxidants substances, such as vitamin C, vitamin E, β -carotene, etc.

Key-words: free radicals, antioxidants, ovary, embryo

⁽¹⁾Trabalho extraído da Dissertação de Mestrado do primeiro autor apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

^(*)Autor para correspondência. (paulolima4045@hotmail.com)

Introdução

A geração de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (EROs), como o radical hidroxila (OH[•]), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e ainda as espécies de nitrogênio (ERN), como o óxido nítrico, é um processo que ocorre naturalmente no organismo devido ao metabolismo celular normal (ORHAN et al., 2006). Portanto, esses radicais participam de reações fisiológicas normais no ovário e no embrião (WELLS et al., 2005), sendo também responsáveis pela indução de processos inflamatórios e respostas imunes (MIGNOTTE e VAYSSIERE, 1998). No entanto, sabe-se que o acúmulo desses componentes em condições onde os mecanismos antioxidantes de defesa estão deficientes pode levar ao estresse oxidativo. Este, por sua vez, é um fenômeno necessário ao crescimento, desenvolvimento e diferenciação celular (TUCKER e TOWNSEND, 2005) e está envolvido em diferentes tipos de injúrias celulares, incluindo a peroxidação lipídica, oxidação de aminoácidos e ácidos nucleicos, apoptose e necrose (HALLIWELL, 1992).

Nos últimos anos tem sido intensivamente estudado o papel dos radicais livres e do estresse oxidativo na reprodução da fêmea mamífera, haja vista os prejuízos causados por estas moléculas no que se refere às patologias reprodutivas e quadros de infertilidade (AGARWAL et al., 2003). A presente revisão sumariza a origem dos radicais livres e suas principais implicações no ovário e embrião mamífero.

Origem das espécies reativas de oxigênio e do estresse oxidativo

O balanço intrínseco entre a vida e a morte celular pode ser influenciado por vários fatores ambientais. O acúmulo intracelular das EROs, como o ânion superóxido (O₂^{-•}), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxila (OH[•]) pode resultar de um insulto tóxico ou do processo metabólico normal. As EROs podem alterar o sistema de defesa antioxidante natural das células, resultando em danos nas principais classes de

macromoléculas biológicas, incluindo os ácidos nucleicos, as proteínas, os carboidratos e os lipídios (CHANDRA et al., 2000). Fisiologicamente, várias moléculas reagem e degradam-se quando expostas ao oxigênio, dentre elas encontram-se os ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares, enzimas, vitaminas e DNA (HALLIWELL, 1997). Estas reações químicas também resultam na formação das EROs ou radicais livres e na presença de íons e de alguns metais no organismo, estes radicais tornam-se altamente reativos, gerando mais radicais livres, sendo então perpetuado o processo (EARLE, 2001).

Partindo-se do princípio que as reações químicas, geralmente, não são quantitativas, pode-se estimar que cerca de 5% do oxigênio inalado seja convertido em EROs (CHANCE et al., 1979). Durante o processo de oxidação que normalmente ocorre nas células, o oxigênio é reduzido à água e os estágios intermediários desse processo correspondem às EROs (SETIADI et al., 2003). Os prejuízos causados no organismo devido à ação dos radicais livres podem se acumular ao longo do tempo e implicar não somente em processos biológicos, como o envelhecimento, mas também em processos patológicos, como inflamação, carcinogênese, Síndrome de Parkinson, catarata (CHANDRA et al., 2000), ooforite (BEHRMAN et al., 2001) e até mesmo resultar em desenvolvimento embrionário anormal (WELLS et al., 2005). As EROs são extremamente reativas e possuem vida curta. No entanto, o aumento na síntese dessas moléculas não causa, necessariamente, injúrias celulares se os mecanismos de defesa antioxidantes estiverem funcionando normalmente (ORHAN et al., 2006).

Os radicais livres podem induzir morte celular por necrose ou apoptose, dependendo das concentrações. Níveis baixos de EROs podem induzir apoptose, enquanto que o acúmulo de altos níveis dessas moléculas gera necrose ou pode levar as células comprometidas por apoptose a uma morte celular semelhante à necrose

(MIGNOTTE & VAYSSIERE, 1998).

O estresse oxidativo é definido como uma elevação intracelular da concentração das EROs (BEDAIWY et al., 2004). As injúrias causadas pelo estresse oxidativo nas células em condições *in vivo* e *in vitro* ocorrem em consequência da exposição a agentes exógenos (radiação, produtos químicos) e devido ao metabolismo celular normal (OLSON e SEIDEL JR., 2000). Sob condições oxidativas extremas ou se os mecanismos de proteção antioxidantes estão comprometidos podem ocorrer injúrias e morte celular por necrose ou apoptose (NASR-ESFAHANI et al., 1990) em decorrência da peroxidação lipídica e de danos ao DNA (HIGUCHI, 2003).

Mecanismos protetores contra as EROs

O organismo possui dois tipos de mecanismos para eliminar ou minimizar a ação da geração excessiva das EROs. Um desses mecanismos compreende as reações enzimáticas, enquanto o outro utiliza substâncias antioxidantes para regular o processo (SETIADI et al., 2003). No primeiro mecanismo é necessária a presença de magnésio, vanádio, cromo, manganês, ferro, cobre, zinco ou selênio no sítio ativo de algumas enzimas, como por exemplo, superóxido dismutase (SOD), catalase (KITAGAWA et al., 2004) e glutathione peroxidase (SETIADI et al., 2003) que removem as EROs das células. A enzima SOD participa da doação do O_2^- ao H_2O_2 , sendo este último convertido pela catalase a oxigênio e água (FRIDOVICH, 1995). A glutathione e a glutathione peroxidase desempenham o maior papel no controle celular da oxidação e são os mecanismos de defesa primários para remoção de peróxidos (HIGUCHI et al., 2003), envolvendo diretamente a ação de vários microelementos. O selênio encontra-se ligado a glutathione peroxidase, agindo como um carreador temporário de oxigênio. O cobre e o zinco estão presentes na SOD juntamente com manganês, ferro e níquel. Estes dois últimos elementos também podem estar presentes na

catalase. A responsabilidade da remoção do peróxido de hidrogênio dos sistemas biológicos é do ferro presente na catalase e do selênio contido na glutathione peroxidase (SETIADI et al., 2003).

No segundo mecanismo entram em ação as vitaminas C e E (BEHRMAN et al., 2001), licopeno, β -caroteno, flavonas, ácido lipóico dentre outras substâncias (AMIS e SHIGENAGA, 1992; CHASSE et al., 2001). Esses antioxidantes são encontrados em frutas e vegetais e suas necessidades no organismo são supridas pela ingestão através da dieta.

A vitamina E (α -tocoferol e derivados) é um antioxidante lipossolúvel presente nas células animais, protegendo-as das injúrias causadas pelos radicais livres (WANG et al., 2002; POVALISHEV et al., 2006). O α -tocoferol, por sua vez, reage com outros radicais livres de forma muito rápida (DUTTA e DUTTA, 2003), evitando a propagação desses radicais pela sua própria conversão num produto oxidado, o radical livre α -tocoferoxil (INGOLD et al., 1987). A forma original do α -tocoferol pode ser regenerada através de sua redução (doação de hidrogênio) pela vitamina C (SCHNEIDER, 2005), aumentando a capacidade antioxidante da vitamina E (TUCKER e TOWNSEND, 2005) e sugerindo o conceito de reciclagem dos antioxidantes. A regeneração do α -tocoferol implica na manutenção da concentração dessa substância na membrana celular (SEN et al., 2006).

A vitamina C (ácido ascórbico) é um importante antioxidante hidrossolúvel que limita a difusão do ânion superóxido na membrana celular e atua também na remoção do H_2O_2 , protegendo os lipídios e as proteínas da membrana celular das injúrias oxidativas (KRAMARENKO et al., 2006).

Espécies reativas de oxigênio no ovário

Vários estudos sugerem que as EROs estejam envolvidas no processo de apoptose ou morte celular programada no ovário (AGARWAL et al., 2003; McCLUSKEY et

al., 1999). Sabe-se que o O_2^- , o H_2O_2 e os peróxidos lipídicos são gerados pelas células luteais durante a regressão natural do corpo lúteo ou induzida por prostaglandina em camundongas (BEHRMAN et al., 2001), sendo esta resposta associada a uma depleção reversível do ácido ascórbico presente nessas células (ATEN et al., 1992; RILEY e BEHRMAN, 1991).

Em oócitos imaturos, os antioxidantes bloqueiam a retomada espontânea da meiose e a maturação oocitária induzida por gonadotrofinas, as quais podem ser revertidas pela geração de radicais livres (TAKAMI et al., 1999; TAKAMI et al., 2000). Tanto nos folículos quanto no corpo lúteo, os leucócitos são a maior fonte de EROs (BEHRMAN et al., 2001). É também conhecido que a maioria dos folículos presentes no ovário (cerca de 99%) não chega a ovular, mas morre pelo processo de atresia, a qual pode ocorrer por via degenerativa ou apoptótica (FIGUEIREDO et al., 1995), podendo esta última ser influenciada pelas EROs.

A geração de radicais livres pode desempenhar importante papel fisiológico no ovário, no entanto, a produção cíclica destes agentes durante anos pode ocasionar patologias ovarianas, as quais, provavelmente, podem ser exacerbadas sob condições antioxidantes precárias. Como exemplo, podem ser citadas a ooforite e a falência ovariana prematura autoimune (BEHRMAN et al., 2001).

Espécies reativas de oxigênio no embrião

As EROs podem ser originadas do metabolismo embrionário normal (GOTO et al., 1993), podem alterar vários tipos de moléculas celulares, bem como podem induzir o bloqueio ou o retardo do desenvolvimento (GUERIN et al., 2001) e comprometer a viabilidade embrionária (OLSON e SEIDEL JR., 2000). No entanto, o papel exato do estresse oxidativo no desenvolvimento embrionário ainda não está bem elucidado.

Estudos mostram que durante a embriogênese pode ocorrer morte celular por apoptose (PARCHMENT, 1991; PIERCE et

al., 1991). Sendo este um fenômeno que ocorre naturalmente nos embriões sob condições *in vivo*, muitos autores sugerem que a apoptose em embriões produzidos *in vitro* pode ser exacerbada devido às condições de cultivo (BYRNE et al., 1999; MATWEE et al., 2000; VAN SOOM et al., 2002). Uma função muito importante da apoptose no desenvolvimento embrionário é a eliminação de uma minoria de células anormais ou supérfluas e no controle do número de células embrionárias (FABIAN et al., 2005).

Os embriões mamíferos em estágios iniciais de desenvolvimento são susceptíveis às injúrias causadas pelas EROs e aumentam a produção de radicais livres quando cultivados *in vitro* (GOTO et al., 1993). Embriões de ratos (UMAOKA et al., 1992), ovinos (THOMPSON et al., 1990) e bovinos (KHURANA e NIEMANN, 2000) cultivados *in vitro* e submetidos a baixas concentrações (5%) de oxigênio mostraram altas taxas de desenvolvimento quando comparados com embriões cultivados sob altas concentrações (20%) deste gás. Este fato é indicativo de que uma alta concentração de oxigênio reduz o desenvolvimento embrionário devido ao acúmulo de EROs (KITAGAWA et al., 2004), estando, portanto, o estresse oxidativo envolvido no desenvolvimento embrionário anormal (BEDAIWY et al., 2004).

Óxido Nítrico

Um outro componente resultante das reações metabólicas e também considerado um radical livre, é o óxido nítrico. Este composto é um gás, cuja molécula é pequena e hidrofóbica, podendo facilmente passar através de membranas (KIECHLE e ZHANG, 2002). Trata-se de um mediador importante de processos fisiológicos e patológicos de injúrias celulares e, provavelmente, da apoptose. Todavia, os mecanismos pelos quais o óxido nítrico induz esse processo permanecem desconhecidos (KIECHLE e ZHANG, 2002). O óxido nítrico é produzido por três tipos de enzimas sintetases: óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS), óxido nítrico sintetase neuronal (nNOS) e óxido

nítrico sintetase indutora (iNOS), que são expressas em vários tecidos (VIÑAS et al., 2005). O perfil fisiológico normal da produção de óxido nítrico é difícil de ser definido, contudo, sabe-se que, quando seus níveis estão aumentados podem ocorrer efeitos tóxicos, visto que o óxido nítrico é um radical livre. Também é conhecido que esta molécula exerce um *feedback* negativo sobre si mesmo, inibindo as enzimas NOS (MITCHELL et al., 2004), bem como que possui um papel duplo como mediador ou supressor na morte celular (KIECHLE e ZHANG, 2002).

O óxido nítrico é um mensageiro bioquímico com diversas ações nos sistemas fisiológicos e está envolvido em vários processos reprodutivos nas fêmeas, tais como ovulação, implantação e contração uterina (MAUL et al., 2003). O óxido nítrico pode prevenir a apoptose em vários tipos celulares, como células endoteliais (DIMMELER et al., 1997) e folículos ovarianos (CHUN et al., 1995). A inibição da apoptose pelo óxido nítrico pode envolver a regulação de sistemas antioxidantes intracelulares, além da inibição de enzimas pró-apoptóticas, como as caspases (KIECHLE e ZHANG, 2002).

No ovário, o óxido nítrico influencia positivamente a remodelação tecidual na ovulação (JABLONKA-SHARIFF e OLSON, 1997). Estudos demonstraram a presença das enzimas NOS em folículos de camundongas em vários estágios de crescimento, onde o desenvolvimento folicular foi comprometido quando foram utilizados inibidores para essas enzimas (MITCHELL et al., 2002). O papel das enzimas NOS também foi demonstrado na maturação oocitária em murinos, as quais agem poucas horas antes da ovulação (NAKAMURA et al., 2002). É também conhecido que o óxido nítrico é um inibidor da esteroidogênese de células da granulosa cultivadas *in vitro* (DAVE et al., 1997). No embrião, o óxido nítrico pode alterar a sinalização embrionária e iniciar a hidroxilação e nitração das proteínas embrionárias e do DNA, afetando diretamente

o desenvolvimento embrionário (MAUL et al., 2003).

Estudos evidenciaram que o óxido nítrico pode levar à morte celular devido à sua alta reatividade com o ânion superóxido. Esta reação aumenta a produção de peroxinitrito, um oxidante altamente tóxico que danifica as células (HSIEH et al., 2006). Sob condições fisiológicas, o peroxinitrito reage rapidamente com o dióxido de carbono (CO₂), resultando na formação de dióxido de nitrogênio (NO₂) e ânion carbonato (CO₃⁻) (UPPU et al., 1996). Esses radicais participam da nitração aromática da tirosina que pode interferir em importantes mecanismos de sinalização celular (MONTEIRO, 2002), como proliferação e diferenciação celular (MONDORO et al., 1997).

Considerações Finais

A geração de radicais livres ou EROs (peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e radical hidroxila) e ERN (óxido nítrico e peroxinitritos) ocorre em processos metabólicos normais, tais como crescimento e diferenciação celular. Essas moléculas podem funcionar como sinalizadoras e indutoras de processos que causam injúrias às células, como a peroxidação dos lipídios das membranas, danos ao DNA e morte celular por apoptose ou necrose, ou simplesmente participar de processos fisiológicos como ovulação, regressão do corpo lúteo e crescimento embrionário. Os níveis intracelulares dessas substâncias é que vão determinar se a célula continua viva ou morre por apoptose ou necrose. Desta forma, observa-se que o papel das substâncias e enzimas antioxidantes no organismo é de fundamental importância para manutenção do equilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes nos sistemas biológicos.

Referências

AGARWAL, A. et al. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**, v.79, p.829-843, 2003.

- ATEN, R.F. et al. Regulation of ovarian antioxidant vitamins, reduced glutathione and lipid peroxidation by luteinizing hormone and prostaglandin F_{2α}. **Biology of Reproduction**, v.46, p.401-407, 1992.
- BEHRMAN, H.R. et al. Oxidative stress and the ovary. **Journal of Society for Gynecology Investigation**, v. 8, p.40-42, 2001.
- BYRNE, A.T. et al. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 117, p.97-105, 1999.
- CHANCE, B. et al. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Reviews**, v.59, p.527, 1979.
- CHANDRA, J. et al. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, p.323-333, 2000.
- CHASSE, G.A. et al. An ab initio computational study on selected lycopene isomers. **Journal of Molecular Structure**, v.571, p.27-37, 2001.
- CHUN, J.Y. et al. Interleukin-1β suppresses apoptosis in rat ovarian follicles by increasing nitric oxide production. **Endocrinology**, v.136, p.3120-3127, 1995.
- DAVE, S. et al. Evidence that nitric oxide inhibits steroidogenesis in cultured rat granulosa cells. **Clinical Science**, v.92, p.277-284, 1997.
- DIMMELER, S. et al. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1β-converting (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. **Journal of Experimental Medicine**, v.185, p.601-608, 1997.
- DUTTA, A.; DUTTA S.K. Vitamin E and its role in the prevention of atherosclerosis and carcinogenesis: a review. **Journal of American College of Nutrition**, v.22, p.258-268, 2003.
- EARLE, K.E. Nutrientes antioxidantes: seu papel em uma dieta saudável. **Temas de Veterinária**, v.3, p.3-9, 2001.
- FABIAN, D. et al. Apoptotic process during mammalian preimplantation development **Theriogenology**, v. 64, p. 221-231, 2005.
- FIGUEIREDO, J.R. et al. Extracellular matrix proteins and basement membrane: their identification in bovine ovaries and significance for the attachment of cultured preantral follicles. **Theriogenology**, v. 43, p. 845-858, 1995.
- FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutase. **Annual Review of Biochemistry**, v.64, p.97-112, 1995.
- GOTO, Y. et al. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured *in vitro*. **Theriogenology** v.15, p.69-75, 1993.
- GUERIN, P. et al. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**, v.7, p.175-189, 2001.
- HALLIWELL, B. et al. Review article: free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.119, p.598-620, 1992.
- HALLIWELL B. Antioxidants and human disease: a general introduction. **Nutrition Review**, p. 44-52, 1997.
- HIGUCHI, Y. Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. **Biochemical Pharmacology**, v.66, p.1527-1535, 2003.
- HSIEH, T.J. et al. Actinodaphnine induces apoptosis through increased nitric oxide, reactive oxygen species and down-regulation of NF-κB signaling in human hepatoma Mahlavi cells. **Food and Chemical Toxicology**, v.44, p.344-354, 2006.
- INGOLD, K.U. et al. Vitamin E remains the major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human plasma even in individuals suffering severe vitamin E deficiency. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.259, p.224-225, 1987.
- JABLONKA-SHARIFF, A.; OLSON, L.M. Hormonal regulation of nitric oxide synthases and their cell-specific expression during follicular development in the rat ovary. **Endocrinology**, v.138, p.460-468, 1997.
- KHURANA, NK; NIEMANN H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 54 p. 741-756, 2000.
- KIECHLE, F.L.; ZHANG, X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. **Clinica Chimica Acta**, v.326, p.27-45, 2002.

- KITAGAWA, Y. et al. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* development ability, production of reactive oxygen species (ROS) and DNA fragmentation in porcine embryos. **Theriogenology**, v.62, p.1186-1197, 2004
- KRAMARENKO, G.G. et al. Ascorbate enhances the toxicity of photodynamic action of Verteporfin in HL-60 cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v.40, n.9, p.1615-1627, 2006.
- MATWEE, C. et al. Apoptosis in the early bovine embryo. **Zygote**, v.8, p.57-68, 2000.
- MAUL, H. et al. Nitric oxide and its role during pregnancy: from ovulation to delivery. **Current Pharmaceutical Design**, v.9, p.359-380, 2003.
- MIGNOTTE, B.; VAYSSIERE, J.L. Mitochondria and apoptosis. **European Journal of Biochemistry**, v.252, p.1-15, 1998.
- MITCHELL, L.M. et al. Pharmacological manipulation of nitric oxide levels in mouse follicle cultures demonstrates key role of extrafollicular control of ovulation. **Human Reproduction**, v.19, n.8, p.1705-1712, 2004.
- MONDORO, T.H. et al. Peroxynitrite-induced tyrosine nitration and phosphorylation in human platelets. **Free Radical Biology & Medicine**, v.22, n.6, p.1055-1063, 1997.
- MONTEIRO HP. Signal transduction by protein tyrosine nitration: competition or cooperation with tyrosine phosphorylation-dependent signaling events? **Free Radical Biology & Medicine**, v.33, n.6, p.765-773, 2002.
- NASR-ESFAHANI, M.H. et al. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed *in vitro* or *in vivo*. **Development**, v.109, p.501-507, 1990.
- OLSON, S.E.; SEIDEL JR, G.E. Culture of *in vitro*-produced bovine embryos with vitamin E improves development *in vitro* and after transfer to recipients. **Biology of Reproduction**, v.62, p.248-252, 2000.
- ORHAN, H. et al. Application of lipid peroxidation and protein oxidation biomarkers for oxidative damage in mammalian cells. A comparison with two fluorescent probes. **Toxicology in Vitro**, v.20, n.6, p.1005-1013, 2006.
- PARCHMENT, R.E. Programmed cell death (apoptosis) in murine blastocysts: extracellular free radicals, polyamines and other cytotoxic agents. **In Vivo**, v.5, p.493-500, 1991.
- PIERCE, G.B. Hydrogen peroxide as a mediator of programmed cell death in the blastocyst. **Differentiation**, v. 46, p.181-186, 1991.
- POVALISHEV, V.N. et al. Effects of α -tocopherol and related compounds on reactions involving various organic radicals. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.16, n.5, p.1236-1239, 2006.
- RILEY, J.C.M.; BEHRMAN, H.R. *In vivo* generation of hydrogen peroxide in the rat corpus luteum during luteolysis. **Endocrinology**, v.128, p.1749-1753, 1991.
- SCHNEIDER, C. Chemistry and biology of vitamin E. **Molecular Nutrients and Food Research**, v.49, p.7-30, 2005.
- SEN, C.K. et al. Tocotrienols: vitamin E beyond tocopherols. **Life Sciences**, v.78, n.18, p.2088-2098, 2006.
- SETIADI, D.H. et al. Vitamin E models. Can the anti-oxidant and pro-oxidant dichotomy of α -tocopherol be related to ionic ring closing and radical ring opening redox reactions? **Journal of Molecular Structure**, v.620, p.93-106, 2003.
- TAKAMI, M. et al. Antioxidants reversibly inhibit the spontaneous resumption of meiosis. **American Journal of Physiology -Cell Physiology**, v.276, p.684-688, 1999.
- TAKAMI, M. et al. Eicosatetraenoic and eicosatrienoic acids, lipoxygenase inhibitors, block meiosis via antioxidant action. **American Journal of Physiology -Cell Physiology**, v. 278, p.646-650, 2000.
- THOMPSON, J.G. et al. Effect of oxygen concentration on *in vitro* development of preimplantation sheep and cattle embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.89, p.573-578, 1990.
- TUCKER, J.M.; TOWNSEND, D.M. Alpha-tocopherol: roles in prevention and therapy of human disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.59, p.380-387, 2005.
- UMAOKA, Y. et al. Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. **Molecular Reproduction Development** v.31, p.28-33, 1992.

UPPU, R.M. et al. Acceleration of peroxy-nitrite oxidations by carbon dioxide. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.327, n.2, p.335-343, 1996.

VAN SOOM, A. et al. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition. **Theriogenology**, v.57, p.1453-1465, 2002.

VIÑAS, J.L. et al. NO and NOS isoforms in the development of apoptosis in renal ischemia/

reperfusion. **Free Radical Biology & Medicine**, v.40, p.992-1003, 2006.

WANG, X. et al. Vitamin-C and vitamin-E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. **Fertility & Sterility**, v.78, p.1272-1277, 2002.

WELLS, P.G. Molecular and biochemical mechanisms in teratogenesis involving reactive oxygen species. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.207, p.352-366, 2005.