

FERNANDA DA SILVA GONÇALVES

**EFEITOS DE ANTIOXIDANTES ADICIONADOS AO MEIO DE
FECUNDAÇÃO *IN VITRO* SOBRE A CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA E
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO EM BOVINOS**

JABOTICABAL

2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

FERNANDA DA SILVA GONÇALVES

**EFEITOS DE ANTIOXIDANTES ADICIONADOS AO MEIO DE
FECUNDAÇÃO *IN VITRO* SOBRE A CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA E
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO EM BOVINOS**

Orientadora: Prof^a Dr^a Gisele Zoccal Mingoti

Dissertação de Mestrado apresentado à
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
– Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte
integrante para a obtenção do título de Mestre
em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

Jaboticabal – São Paulo – Brasil

Fevereiro de 2006

DEDICO

Aos meus pais,

Antônia Santa da Silva Gonçalves e

Sebastião Benedito Gonçalves

Por sempre estarem presentes em minha vida.

Ensinando ...

apoiando nos momentos de dificuldade e de conquistas

e dedicando

com muito carinho o vosso enorme amor

Com muito amor

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me dar saúde, paz e coragem para sempre seguir em frente.

Especialmente para a **Profª Drª Gisele Zoccal Mingoti** pela amizade, paciência, dedicação, confiança e sabedoria de ser uma grande orientadora.

Ao **Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda** pela sua grande colaboração na elaboração deste trabalho e auxílio nas técnicas de coloração do sêmen utilizadas neste experimento.

Ao **Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia** pela indicação da professora Gisele e auxílio no desenvolvimento do trabalho.

À **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP – Câmpus de Jaboticabal** pela oportunidade da realização do Mestrado e à **Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP – Câmpus de Araçatuba** pelo acolhimento e ambiente de trabalho.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela concessão da Bolsa de Estudos.

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo auxílio técnico para o desenvolvimento dessa pesquisa.

À **Profª Drª Sílvia Helena Venturoli Perri** pelas orientações estatísticas e análise dos resultados.

À **Drª Eneiva Carla Carvalho Celeghini** pela paciência e enorme ajuda em ensinar as técnicas de coloração do sêmen usadas neste trabalho.

“A mi amor” e companheiro, **Nando**, pelo enorme carinho, amor e incentivo a que sempre me dedica. Ofereço a você este trabalho de coração.

A minha irmã **Maria do Carmo**, ao meu cunhado **Marcelo** e afilhadinha **Maria Fernanda** pela confiança, carinho e incentivo.

À colega e compaheira de laboratório **Letícia Siqueira de Sá Baretto** pelo grande auxílio nas técnicas deste experimento.

Aos **meus queridos amigos** Malu, Carminha, Ricardo, Sabrina, Raphael, Maria Eliane, Gláucia, Fabiano, Simone, Gabi, Beth, Jyorô, Banda, Daniel, Dani, Stéfano, Cicika, Alisson e Camila pelo grande carinho, amizade e pelos bons momentos de descontração.

Ao funcionário **Adão** pelo trabalho em buscar os ovários, no abatedouro.

A todos os **professores** e **colegas** do Departamento de Reprodução Animal (FCAV-UNESP-Jaboticabal).

Aos **animais** e **embriões**, que doando sua existência foram os principais instrumentos para a realização deste trabalho.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram com incentivo, apoio e ajuda para que esse trabalho se tornasse realidade.

APOIO FINANCEIRO

Este projeto teve bolsa concedida Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, sob o processo nº 131861/2004-2 e foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, sob o processo nº 04/13148-7.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
ABREVIATURAS	xvii
SÍMBOLOS	xxi
RESUMO - Efeitos de antioxidantes adicionados ao meio de fecundação <i>in vitro</i> sobre a capacitação espermática e desenvolvimento embrionário em bovinos	xxii
ABSTRACT - Effects of supplementation with antioxidants of the fecundation medium <i>in vitro</i> on sperm capacitation and competence of the embryonic development in bovine	xxiv
CAPÍTULO 1 - Considerações Iniciais	25
1 Introdução	25
2 Objetivos	28
2.1 Objetivos Gerais	28
2.2 Objetivos Especificos	28
3 Hipóteses	29
4 Revisão de Literatura	30
4.1 Maturação <i>in vitro</i>	30
4.2 Fecundação e Fertilidade	32
4.3 Desenvolvimento Embrionário	33
4.4 Antioxidantes	37
4.5 Estrutura do Espermatozóide	39
4.5.1 Cabeça	40
4.5.2 Flagelo	41
4.5.3 Membranas Espermáticas	42
4.6 Uso de Sondas Fluorescentes para Avaliação Espermática	43
4.6.1 Avaliação da Membrana Plasmática	44
4.6.2 Avaliação da Membrana do Acrossomo	45
4.6.3 Avaliação da Função Mitocondrial	46
4.6.4 Avaliação da Estrutura da Cromatina	48
4.7 Associação de Sondas Fluorescentes	49
5 Referências	51

CAPÍTULO 2 – Efeitos de antioxidantes adicionados ao meio de fecundação <i>in vitro</i> sobre o desenvolvimento embrionário bovino	62
RESUMO	62
1 Introdução	64
2 Material e Método	67
2.1 Obtenção e Seleção de oócitos	67
2.2 Maturação <i>in vitro</i>	67
2.3 Fertilização <i>in vitro</i>	67
2.4 Cultivo Embrionário <i>in vitro</i>	68
2.5 Determinação da Massa celular interna (MCI) e Trofodema (TF)	69
2.6 Delineamento experimental	70
2.6.1 Experimento 1 – Avaliação das taxas de clivagem e do desenvolvimento embrionário	70
2.6.2 Experimento 2 – Determinação da qualidade proporcional do número da MCI e TF nos embriões CIV	71
2.7 Análise Estatística	72
3 Resultado	74
3.1 Experimento 1 – Avaliação das taxas de clivagem e do desenvolvimento embrionário	74
3.2 Experimento 2 – Determinação da qualidade proporcional do número da MCI e TF nos embriões CIV	80
4 Discussão	87
5 Conclusão	94
6 Referências	95
CAPÍTULO 3 – Avaliação dos efeitos de antioxidantes adicionados ao meio de fecundação <i>in vitro</i> sobre o espermatozóide bovino pela associação de sondas fluorescentes	100
RESUMO	100
1 Introdução	102
2 Material e Método	104
2.1 Obtenção e seleção dos oócitos	104
2.2 Maturação <i>in vitro</i>	104
2.3 Fecundação <i>in vitro</i>	104
2.4 Avaliação da integridade das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial	106

2.5 Integridade da Cromatina	107
2.6 Delineamento Experimental	108
2.6.1 Experimento 1 – Avaliação da integridade das membranas plasmática, acrossomal, e potencial mitocondrial .pela associação de sondas fluorescentes	109
2.6.2 Experimento 2 – Avaliação da integridade da cromatina	110
2.7 Análise Estatística	110
3 Resultado	112
3.1 Experimento 1 – Avaliação da integridade das membranas plasmática, acrossomal, e potencial mitocondrial .pela associação de sondas fluorescentes	112
3.2 Experimento 2 – Avaliação da integridade da cromatina	129
4 Discussão	131
5 Conclusão	136
6 Referências	137

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 – EFEITO DE ANTIOXIDANTES ADICIONADOS AO MEIO DE FECUNDAÇÃO *IN VITRO* SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO BOVINO

Tabela 1-	Preparação dos meios de maturação, fecundação e cultivo <i>in vitro</i>	70
Tabela 2-	Porcentagem média de clivagem de oócitos fecundados <i>in vitro</i> em meio FIV contendo ou não antioxidantes, com sêmen capacitado ou não com heparina	75
Tabela 3-	Porcentagem média de blastocistos produzidos 168 horas após a fecundação <i>in vitro</i> de oócitos em meio FIV contendo ou não antioxidantes, com sêmen capacitado ou não com heparina	76
Tabela 4-	Porcentagem média de blastocistos produzidos 192 horas após a fecundação <i>in vitro</i> de oócitos em meio FIV contendo ou não antioxidantes, com sêmen capacitado ou não com heparina	78
Tabela 5-	Porcentagem média de blastocistos eclodidos 168 horas produzidos após a fecundação <i>in vitro</i> de oócitos em meio FIV contendo ou não antioxidantes, com sêmen capacitado ou não com heparina	79
Tabela 6-	Porcentagem média da massa celular interna (MCI) em relação ao número de blastocistos produzidos sete dias após a fecundação <i>in vitro</i> em meio FIV contendo ou não antioxidantes, com sêmen capacitado ou não com heparina	81
Tabela 7-	Porcentagem média do trofotoderma (TF) em relação ao número de blastocistos produzidos sete dias após a fecundação <i>in vitro</i> em meio FIV contendo ou não antioxidantes, com sêmen capacitado ou não com heparina	83
Tabela 8-	Freqüência (%) média de blastocistos de qualidade superior (MCI >20; TF>46; T>75 e MCI:TF≥1:2) produzidos sete dias após a fecundação <i>in vitro</i> em meio FIV contendo ou não antioxidantes, com sêmen capacitado ou não com heparina	84
Tabela 9-	Freqüência (%) média de blastocistos de qualidade excelente (MCI >31; TF>67; T>94) produzidos sete dias após a fecundação <i>in vitro</i> em meio FIV contendo ou não antioxidantes, com sêmen capacitado ou não com heparina	85

CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE ANTIOXIDANTES ADICIONADOS AO MEIO DE FECUNDAÇÃO *IN VITRO* SOBRE O ESPERMATOZÓIDE BOVINO PELA ASSOCIAÇÃO DE SONDAS FLUORESCENTES

Tabela 1-	Classificação das células espermáticas de acordo com a coloração fluorescente emitida no protocolo de associação de PI, FITC-PSA e JC-1	107
Tabela 2-	Preparação dos meios de maturação, fecundação e cultivo <i>in vitro</i>	109
Tabela 3-	Porcentagem média de espermatozóides com membrana plasmática íntegra, acrossomo íntegro e com potencial mitocondrial (IIC) durante a fecundação <i>in vitro</i> em meio contendo ou não antioxidante, na presença ou ausência de heparina	114
Tabela 4-	Porcentagem média de espermatozóides com membrana plasmática íntegra, acrossomo íntegro e sem potencial mitocondrial (IIS) durante a fecundação <i>in vitro</i> em meio contendo ou não antioxidante, na presença ou ausência de heparina	115
Tabela 5-	Porcentagem média de espermatozóides com membrana plasmática íntegra, acrossomo lesado e com potencial mitocondrial (ILC) durante a fecundação <i>in vitro</i> em meio contendo ou não antioxidante, na presença ou ausência de heparina	117
Tabela 6-	Porcentagem média de espermatozóides com membrana plasmática íntegra, acrossomo lesado e sem potencial mitocondrial (ILS) durante a fecundação <i>in vitro</i> em meio contendo ou não antioxidante, na presença ou ausência de heparina	118
Tabela 7-	Porcentagem média de espermatozóides com membrana plasmática lesada, acrossomo íntegro e com potencial mitocondrial (LIC) durante a fecundação <i>in vitro</i> em meio contendo ou não antioxidante, na presença ou ausência de heparina	120
Tabela 8-	Porcentagem média de espermatozóides com membrana plasmática lesada, acrossomo íntegro e sem potencial mitocondrial (LIS) durante a fecundação <i>in vitro</i> em meio	

contendo ou não antioxidante, na presença ou ausência de heparina	121
Tabela 9- Porcentagem média de espermatozóides com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e com potencial mitocondrial (LLC) durante a fecundação <i>in vitro</i> em meio contendo ou não antioxidante, na presença ou ausência de heparina	123
Tabela 10- Porcentagem média de espermatozóides com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e sem potencial mitocondrial (LLS) durante a fecundação <i>in vitro</i> em meio contendo ou não antioxidante, na presença ou ausência de heparina	124
Tabela 11- Porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática intacta durante a fecundação <i>in vitro</i> em meio contendo ou não antioxidante, na presença ou ausência de heparina	126
Tabela 12- Porcentagem de espermatozóides com acrossoma intacto durante a fecundação <i>in vitro</i> em meio contendo ou não antioxidante, na presença ou ausência de heparina	127
Tabela 13- Porcentagem de espermatozóides com alto potencial mitocondrial durante a fecundação <i>in vitro</i> em meio contendo ou não antioxidante, na presença ou ausência de heparina	128
Tabela 14- Porcentagem média de espermatozóides com cromatina íntegra durante a fecundação <i>in vitro</i> em meio suplementado com antioxidantes (Cisteamina – Cist ou 2- Mercaptoetanol – 2-ME) ou com inibidor da síntese de glutatona (<i>DL-Buthionine Sulfoximine</i> – BSO), na ausência ou presença de heparina, nos tempos 0 hora e 4 horas após o início da FIV	130

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2 – EFEITO DE ANTIOXIDANTES ADICIONADOS AO MEIO DE FECUNDAÇÃO *IN VITRO* SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO BOVINO

- Figura 1-** Esquema da fecundação *in vitro* e avaliação da clivagem e desenvolvimento embrionário 70
- Figura 2-** Esquema da fecundação *in vitro* e coloração diferencial dos embriões por fluorocromo (Hoechst 33342) 72
- Figura 3-** Blastocisto (sete dias após a FIV) analisados pela técnica de coloração diferencial, sob microscopia de epifluorescência. Azul (Hoechst 33342): núcleos de células da massa celular interna (MCI); Vermelho (iodeto de propídio-PI) núcleo de células do trofotoderma (TF). Imagens digitalizadas 75
- Figura 4-** Porcentagem média de clivagem de oócitos fecundados *in vitro* em meio FIV contendo antioxidantes (Cisteamina ou 2-Mercaptoetanol) ou inibidor da síntese de GSH (*DL-Buthionine Sulfoximide*-BSO), com sêmen capacitado ou não com heparina 76
- Figura 5-** Porcentagem média de blastocistos produzidos 168 horas após a fecundação *in vitro* em meio FIV contendo ou não antioxidantes, com sêmen capacitado ou não com heparina 78
- Figura 6-** Porcentagem média de blastocistos produzidos 192 horas após fecundação *in vitro* em meio FIV contendo ou não antioxidantes, com sêmen capacitado ou não com heparina 79
- Figura 7-** Porcentagem média de blastocistos eclodidos produzidos 192 horas após fecundação *in vitro* em meio FIV contendo ou não antioxidantes, com sêmen capacitado ou não com heparina 80
- Figura 8-** Porcentagem média da massa celular interna (MCI) em relação ao número de blastocistos produzidos sete dias após a fecundação *in vitro* em meio FIV contendo ou não antioxidantes, com sêmen capacitado ou não com heparina 81
- Figura 9-** Porcentagem média do trofotoderma em relação ao número de blastocistos produzidos sete dias após a fecundação *in vitro* em meio FIV contendo ou não antioxidantes, com sêmen capacitado ou não com heparina 83

- Figura 10-** Frequência (%) média de blastocistos de qualidade superior (MCI >20; TF>46; T>66) produzidos sete dias após a fecundação *in vitro* em meio FIV contendo ou não antioxidantes, com sêmen capacitado ou não com heparina 84
- Figura 11-** Frequência (%) média de blastocistos de qualidade excelente (MCI >31; TF>67; T>94) produzidos sete dias após a fecundação *in vitro* em meio FIV contendo ou não antioxidantes, com sêmen capacitado ou não com heparina 86
- CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE ANTIOXIDANTES ADICIONADOS AO MEIO DE FECUNDAÇÃO *IN VITRO* SOBRE O ESPERMATOZÓIDE BOVINO PELA ASSOCIAÇÃO DE SONDAS FLUORESCENTES**
- Figura 1-** Esquema da fecundação *in vitro* e coloração das membranas espermáticas (plasmática, acrossomal e mitocondrial) com as sondas fluorescentes (PI, FITC-PSA e JC-1) 109
- Figura 2-** Esquema da fecundação *in vitro* e coloração da cromatina espermática com “Acridine Orange” (AO) 110
- Figura 3-** Fotomicrografia de epifluorescência das células espermáticas coradas com associação das sondas fluorescentes PI, FITC-PSA e JC-1. A. Células com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e sem potencial mitocondrial (LLS) B. Células com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e sem potencial mitocondrial (LLS) (seta) e células com membrana plasmática lesada, acrossomo íntegro e sem potencial mitocondrial (LIS) (seta tracejada) C. Células com membrana plasmática lesada, acrossomo íntegro e sem potencial mitocondrial (LIS) (vermelhas) e células com membrana plasmática íntegra, acrossomo íntegro e sem potencial mitocondrial (IIS) (verdes). D. Células com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e sem potencial mitocondrial (LLS). Imagens digitalizadas 112
- Figura 4-** Representação gráfica da porcentagem média de espermatozoides com membrana plasmática íntegra, acrossomo íntegro e com potencial mitocondrial (IIC) durante a fecundação em meio suplementado com antioxidantes (Cisteamina – Cist ou 2-Mercaptoetanol - 2-ME) ou um inibidor da síntese de glutathione (*DL-Buthionine Sulfoximine* - BSO), na ausência ou presença de heparina, nos tempos 0 hora e 4 horas após o início da FIV 114

- Figura 5-** Representação gráfica da porcentagem média de espermatozóides com membrana plasmática íntegra, acrossomo íntegro e sem potencial mitocondrial (IIS) durante a fecundação em meio suplementado com antioxidantes (Cisteamina – Cist ou 2-Mercaptoetanol - 2-ME) ou um inibidor da síntese de glutathione (*DL-Buthionine Sulfoximine* - BSO), na ausência ou presença de heparina, nos tempos 0 hora e 4 horas após o início da FIV 115
- Figura 6-** Representação gráfica da porcentagem média de espermatozóides com membrana plasmática íntegra, acrossomo lesado e com potencial mitocondrial (ILC) durante a fecundação em meio suplementado com antioxidantes (Cisteamina – Cist ou 2-Mercaptoetanol - 2-ME) ou um inibidor da síntese de glutathione (*DL-Buthionine Sulfoximine* - BSO), na ausência ou presença de heparina, nos tempos 0 hora e 4 horas após o início da FIV 117
- Figura 7-** Representação gráfica da porcentagem média de espermatozóides com membrana plasmática íntegra, acrossomo lesado e sem potencial mitocondrial (ILS) durante a fecundação em meio suplementado com antioxidantes (Cisteamina – Cist ou 2-Mercaptoetanol - 2-ME) ou um inibidor da síntese de glutathione (*DL-Buthionine Sulfoximine* - BSO), na ausência ou presença de heparina, nos tempos 0 hora e 4 horas após o início da FIV 118
- Figura 8-** Representação gráfica da porcentagem média de espermatozóides com membrana plasmática lesada, acrossomo íntegro e com potencial mitocondrial (LIC) durante a fecundação em meio suplementado com antioxidantes (Cisteamina – Cist ou 2-Mercaptoetanol - 2-ME) ou um inibidor da síntese de glutathione (*DL-Buthionine Sulfoximine* - BSO), na ausência ou presença de heparina, nos tempos 0 hora e 4 horas após o início da FIV 120
- Figura 9-** Representação gráfica da porcentagem média de espermatozóides com membrana plasmática lesada, acrossomo íntegro e sem potencial mitocondrial (LIS) durante a fecundação em meio suplementado com antioxidantes (Cisteamina – Cist ou 2-Mercaptoetanol - 2-ME) ou um inibidor da síntese de glutathione (*DL-Buthionine Sulfoximine* - BSO), na ausência ou presença de heparina, nos tempos 0 hora e 4 horas após o início da FIV 121
- Figura 10-** Representação gráfica da porcentagem média de espermatozóides com membrana plasmática lesada,

- acrossomo lesado e com potencial mitocondrial (LLC) durante a fecundação em meio suplementado com antioxidantes (Cisteamina – Cist ou 2-Mercaptoetanol - 2-ME) ou um inibidor da síntese de glutathione (*DL-Buthionine Sulfoximine* - BSO), na ausência ou presença de heparina, nos tempos 0 hora e 4 horas após o início da FIV 123
- Figura 11-** Representação gráfica da porcentagem média de espermatozoides com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e sem potencial mitocondrial (LLS) durante a fecundação em meio suplementado com antioxidantes (Cisteamina – Cist ou 2-Mercaptoetanol - 2-ME) ou um inibidor da síntese de glutathione (*DL-Buthionine Sulfoximine* - BSO), na ausência ou presença de heparina, nos tempos 0 hora e 4 horas após o início da FIV 124
- Figura 12-** Representação gráfica da porcentagem média de espermatozoides com membrana plasmática íntegra durante fecundação em meio suplementado com antioxidantes (Cisteamina - Cist ou 2-Mercaptoetanol - 2-ME) ou com um inibidor da síntese de glutathione (*DL-Buthionine Sulfoximine* - BSO), na ausência ou presença de heparina, nos tempos 0 hora e 4 horas após o início da FIV 126
- Figura 13-** Representação gráfica da porcentagem média de espermatozoides com acrossoma íntegro durante fecundação em meio suplementado com antioxidantes (Cisteamina - Cist ou β -Mercaptoetanol - 2-ME) ou com um inibidor da síntese de glutathione (*DL-Buthionine Sulfoximine* - BSO), na ausência ou presença de heparina, nos tempos 0 hora e 4 horas após o início da FIV 127
- Figura 14-** Representação gráfica da porcentagem média de espermatozoides com alto potencial mitocondrial durante fecundação em meio suplementado com antioxidantes (Cisteamina - Cist ou 2-Mercaptoetanol - 2-ME) ou com um inibidor da síntese de glutathione (*DL-Buthionine Sulfoximine* - BSO), na ausência ou presença de heparina, nos tempos 0 hora e 4 horas após o início da FIV 129
- Figura 15-** Fotomicrografia de epifluorescência das células espermáticas coradas com “Acridine Orange” (AO). A e B. Espermatozoides normais com cromatina íntegra (fluorescência verde) C. Espermatozoide anormal com cromatina lesada (cor vermelha). Imagens digitalizadas 130

ABREVIATURAS

ANOVA= Análise de variância

AO= Acridine orange

BI= Blastocisto

BSA= Albumina sérica bovina

BSO= "DL- Buthionine Sulfoximide"

Ca⁺⁺= íon cálcio

CIV= Cultivo *in vitro*

CO₂= Dióxido de carbono

COCs= Complexos-*cumulus*-oócitos

Cist= Cisteamina

Cu= Íon Cobre

DNA= Ácido desoxiribonucléico

EPM= Erro padrão da média

Fe= Íon Ferro

FITC= Isotiocianato de fluoresceína

FITC-PSA= Aglutinina de *Pisum sativum* conjugada a isotiocianato de fluoresceína

FIV= Fecundação *in vitro*

FSH= Hormônio folículo estimulante

GPX= Glutathione peroxidase

GSH= Glutathione

GSH/GSSG= Glutathione reduzida/glutathione oxidada

GV= Vesícula germinativa

GVBV= Quebra da vesícula germinativa

hCG= Gonadotrofina coriônica humana

HEPES= N-(2-Hydroxyethyl) piperazine-N'- (2-ethanesulfonic acid); 4- (2-Hydroxyethyl) piperazine- 1-ethanesulfonic acid

Hpi= Horas após inseminação

H₂O₂= Peróxido de hidrogênio

IIC= Membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e com potencial mitocondrial

IIS= Membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e sem potencial mitocondrial

ILC= Membrana plasmática intacta, acrossomo lesado e com potencial mitocondrial

ILS= Membrana plasmática intacta, acrossomo lesado e sem potencial mitocondrial

LIC= Membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e com potencial mitocondrial

LIS= Membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e sem potencial mitocondrial

LLC= Membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e com potencial mitocondrial

LLS= Membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e sem potencial mitocondrial

JC-1= Iodeto de 5',5',6,6' - tetracloro-1,1,3,3' - tetraetilbenzimidazolilcarbocianina

LH= Hormônio luteinizante

MCI= Massa celular interna

MCI:TF= Proporção entre massa celular interna e trofectoderma

MIV= Maturação *in vitro*

MITO= Mito tracker green FM®

mL= Mililitros

mm= Milímetro

mM= Mili molar

MII= Metáfase II

2-ME= 2-Mercaptoetanol

O₂⁻= Radical ânion superóxido

OH⁻= Radical hidroxila

PKC= Proteína quinase C

PI= Iodeto de propídio
PIV= Produção *in vitro* de embriões
REDOX= Estado de óxido-redução
RNA= Ácido ribonucléico
ROS= Espécies reativas ao oxigênio
RPM= Rotações por minuto
R123= Rodamina 123
SFB= Soro fetal bovino
SOD= Superóxido dismutase
SOFaa= Meio de cultivo “Synthetic Oviduct Fluid” com aminoácidos
PHE= Penicilamina, hipotaurina e epinefrina
PSA= Aglutinina de *Pisum sativum*
PVP= Polivinil-pirrolidona
T= Total de células constituintes do embrião
TALP-FIV= Tyrode’s albumina lactato piruvato
TCM= Meio de cultura para tecidos
TF= Trofotoderma
TUNEL= “Terminal Transferase Assay”
TE=Transferência de embriões
 μ L= Micro litro
 μ M= Micro molar
U/mL= Unidade por mililitros
 μ g= Micro grama
ZP= Zona pelúcida

SÍMBOLOS

α = alfa

β = beta

$^{\circ}\text{C}$ = graus Celsius

G = Gauge

% = porcentagem

g = gravidade

10^3 = mil

10^6 = milhões

\pm = mais ou menos

$<$ = menor

$>$ = maior

* = asterisco

: = proporção

GONÇALVES, F.S. **Efeitos de antioxidantes adicionados ao meio de fecundação *in vitro* sobre a capacitação espermática e desenvolvimento embrionário em bovinos.** 2006 140f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal, 2006.

RESUMO. Recentemente, tem-se dado atenção crescente aos efeitos deletérios dos radicais livres sobre os oócitos e embriões cultivados *in vitro* em mamíferos. No entanto, poucos estudos foram conduzidos sobre a ação desses agentes sobre a interação entre o espermatozóide-oócito durante a fertilização *in vitro* (FIV). Com o intuito de melhorar os resultados da produção *in vitro* de embriões bovinos, este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos da suplementação do meio de fecundação *in vitro* com antioxidantes cisteamina (Cist) e 2-Mercaptoetanol (2-ME) sobre a capacitação espermática, fecundação, qualidade dos zigotos e competência no desenvolvimento embrionário. Oócitos foram maturados *in vitro* (MIV) por 24h a 38,5°C e 5% de CO₂ em meio TCM-199 suplementados com 10% SFB). O meio de fecundação foi o TALP suplementado ou não com 10 µg de heparina e 160 µL da solução de PHE (denominados respectivamente de TALP-FIV/Hep+PHE ou TALP-FIV) que, dependendo do grupo experimental, foram suplementados com 50 µM de 2-Mercaptoetanol (2-ME), ou 50 µM de Cisteamina (Cist) ou 5 mM de DL-Buthionine-Sulfoximine (BSO) ou não receberam suplementação (CONTROLE). Os zigotos foram cultivados em meio SOFaa + 0,5%BSA +2,5%SFB. No Exp.1 foram avaliados o desenvolvimento e qualidade de embriões. No Exp.2, foi coletada uma amostra de sêmen da placa de fertilização nos tempos 0 e 4 horas para a avaliação da integridade das membranas plasmática, acrossomal, função mitocondrial e integridade da cromatina. No Exp.1, as taxas médias de clivagem tanto entre os grupos (Contr, Cist, 2-ME e BSO) como entre os meios TALP-FIV na presença ou ausência de heparina não apresentaram

diferença significativa ($P>0,05$). A adição de cisteamina no meio de fecundação influenciou negativamente ($P<0,05$) o desenvolvimento embrionário nas fases de blastocistos (BI) 168 e 192 hpi tanto entre os grupos como nos meios TALP-FIV (com/sem heparina). A cisteamina mostrou uma taxa de eclosão (192 hpi) menor ($P<0,05$) que o 2-ME. E quando o meio FIV foi suplementado com 2-ME na presença de heparina, esta demonstrou um efeito benéfico ($P<0,05$) sobre a taxa de eclosão (BI 192hpi). Não houve diferença estatística ($P>0,05$) sobre o número de células da MCI e do TF entre os grupos e também entre os meios TALP-FIV (com/sem heparina). No Exp.2 houve uma queda ($P<0,05$) nas médias de espermatozoides que preservaram a integridade de membrana plasmática durante o tempo (0 e 4 horas durante a FIV). O 2-ME apresentou dados significativamente menores ($P<0,05$) no tempo 4 horas no meio TALP-FIV sem heparina em relação ao mesmo meio no tempo 0 hora tanto para integridade acrossomal quanto para o potencial mitocondrial. Não houve diferença entre as médias sobre integridade da cromatina tanto entre os grupos, entre os tempos e entre os meios TALP-FIV. A presença dos antioxidantes cisteamina e do 2-ME não influenciou as taxas de clivagem, como também a qualidade proporcional do número de células da MCI e do TF. Contudo, a cisteamina promoveu queda nas taxas de blastocistos (168 e 192 hpi) e de eclosão (192 hpi). No entanto, a presença de heparina promoveu um aumento na produção de blastocistos e um efeito benéfico sobre a eclosão, quando meio TALP-FIV foi suplementado com antioxidantes 2-ME. Os dados do Exp.2 demonstraram que não houve efeitos dos antioxidantes em preservar a integridade das membranas plasmática, acrossomal e função mitocondrial. Os espermatozoides apresentaram o DNA íntegro quase na totalidade entre os diferentes tratamentos e durante o tempo no processo da FIV.

Palavras-chave: Antioxidantes, FIV, espermatozóide, desenvolvimento embrionário, bovino

GONÇALVES, F.S. **Effects of supplementation with antioxidants of the fecundation medium *in vitro* on sperm capacitation and competence of the embryonic development in bovine.** 2006 140f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal, 2006.

ABSTRACT. Recently, deleterious effects of free radicals over oocytes and embryos cultivated *in vitro* in mammals have received increasing attention. Nonetheless, few studies were conducted about the action of those agents over the interaction between the sperm-oocyte during *in vitro* fertilization (IVF). Aimed at improving results of *in vitro* production of bovine embryos, this work had as objective to evaluate the effects of supplementation of the *in vitro* fertilization environment with antioxidants cysteamine (Cist) and 2-Mercaptoethanol (2-ME) over the spermatocapacitation, fertilization, quality of zygotes and competency in the embryonic development. Oocytes were matured *in vitro* (IVM) for 24h at 38,5°C and 5% of CO₂ in an environment TCM-199 supplemented with 10% SFB. Fertilization environment was the TALP supplemented and non-supplemented with 10 µg of heparin and 160 µL of PHE solution (denominated TALP-IVF/Hep+PHE or TALP-IVF, respectively) that, depending on the experimental group, were supplemented with 50 µM of 2-Mercaptoethanol (2-ME), or 50 µM of Cisteamine (Cist) or 5 mM of DL-Buthionine-Sulfoximine (BSO) or did not received supplementation (CONTROL). Zygotes were cultivated in an environment SOFaa + 0,5%BSA +2,5%SFB. In Exp 1, the development and quality of embryos were evaluated. In Exp 2, a sample of sperm from the fertilization board at times 0 and 4 hours were collected in order to evaluate the integrity of the plasmatic and acrosomal membranes, mitochondrial function and integrity of chromatin. In Exp 1, cleavage average ratio among the groups (Contr, Cist, 2-ME and BSO) and among the environments TALP-IVF during the presence or absence of heparin did not exhibit significative difference (P>0,05). Addition of cysteamine in the fertilization environment influenced negatively (P<0,05) the embryonic development during the blastocysts stage (BI) 168

and 192 hpi for both groups and environments TALP-IVF (with/without heparin). Cisteamine showed an explosion ratio (192 hpi) smaller ($P < 0,05$) than the 2-ME. When the IVF environment supplemented with 2-ME during the presence of heparin, an beneficial effect was observed ($P < 0,05$) over the explosion ratio (BI 192hpi). There was not statistical difference ($P > 0,05$) over the number of cells of MCI and of TF among the groups as well as among the environments TALP-IVF (with/without heparin). In Exp 2 it was observed a drop ($P < 0,05$) in the average of spermatozoas that preserved the integrity of the plasmatic membrane along the time (0 and 4 hours during IVF). 2-ME presented data considerably smaller ($P < 0,05$) at time 4 hours with the environment TALP-IVF without heparin in relation to the same environment at time 0 hours for both acrosomal integrity and mitochondrial potential. There was no difference between average over chromatin integrity among groups, times and environments TALP-IVF. Presence of antioxidants cisteamine and 2-ME did not influence cleavage ratios, neither the proportional quality of the number of cell of MCI and TF. Nonetheless, cisteamine promoted a drop in the blastocysts ratios (168 and 192 hpi) and explosion (192 hpi). On the other hand, presence of heparin promoted an increase in the production of blastocysts and an beneficial effect over the explosion when the environment TALP-IVF was supplemented with antioxidants 2-ME. Data from Exp 2 demonstrated that there were no effects of antioxidants respect to the preservation of the integrity of the plasmatic and acrosomal membranes, and the mitochondrial function. Spermatozoas exhibited an integral DNA almost in the totality of the different treatments and along the time in the IVF process.

Keywords: Antioxidants, IVF, spermatozoa, embryonic development, bovine.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO

As técnicas de produção *in vitro* de embriões (PIV) e sua incorporação na pecuária avançou rapidamente na última década. Com o desenvolvimento da punção folicular guiada por ultra-som, tornou-se possível a recuperação de oócitos de fêmeas vivas para fecundação *in vitro* (FIV), abrindo novos caminhos para multiplicação de animais de interesse econômico e superando os atuais índices no que diz respeito à produção bezerro/vaca/ano (PEIXER, 2000).

O processo de PIV compreende três etapas desenvolvidas no laboratório: a maturação *in vitro* (MIV), a fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo para o desenvolvimento embrionário *in vitro* (CIV) até os estádios de mórula ou blastocisto, quando poderão ser transferidos ou criopreservados. Para a obtenção de melhores resultados com a técnica, muitos estudos têm sido realizados visando avaliar individualmente cada uma das três etapas, procurando ajustar da melhor maneira possível todas as variáveis envolvidas no processo.

A importância da proteção na fase de pré-implantação de embriões *in vitro* contra os danos causados pelo estresse oxidativo está sendo cada vez mais reconhecida. A redução da concentração de oxigênio dos gases do ambiente pode proteger oócitos e embriões contra o estresse oxidativo, e isto pode ser obtido pela co-cultura com células e/ou pela adição de suplementos, principalmente antioxidantes, ao meio de cultura (GUÉRIN et al., 2001).

Esta preocupação deve-se ao fato de que a concentração de O₂ no lúmen do trato reprodutivo feminino é de aproximadamente um terço (3 a 9%) do que a encontrada nos sistemas de produção *in vitro* de embriões de bovinos (aproximadamente 20% em ar atmosférico) (MASTRIOANNI; JONES, 1965). Nos processos de fecundação *in vitro* em mamíferos, os

gametas são expostos ao oxigênio e à irradiação da luz visível durante vários procedimentos da técnica. O metabolismo aeróbico pode permitir a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais são formadas durante passos intermediários da redução de oxigênio: radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\cdot}) (GUÉRIN et al., 2001). O sistema de cultivo de embriões *in vitro* com alta tensão de oxigênio (20%) pode produzir mais radicais livres (FOWLER; CALLINGHAM, 1978) do que em sistemas onde os embriões são cultivados com 5 ou 7% de O_2 (LIU; FOOTE, 1995; NASR-ESFAHANI et al., 1990;).

De Matos et al., (1996) demonstraram que a adição de cisteamina, cisteína e 2-mercaptoetanol ao meio de maturação aumentou a síntese de glutathiona (GSH) no oócito bovino durante a MIV. Este aumento no conteúdo de GSH supria os oócitos maturados *in vitro* de um grande estoque de GSH disponível para proteção do embrião até o estágio de blastocisto (DE MATOS et al., 1995; DE MATOS et al., 1996; TELFORD et al., 1990), o que melhorou a eficiência da produção *in vitro* de embriões.

As técnicas de PIV de embriões de mamíferos envolvem a criopreservação de gametas e de embriões. Já foi demonstrado que o processo de congelação/descongelação reduz a concentração de GSH em torno de 78% no espermatozóide bovino (BILODEAU et al., 1999), o que pôde explicar alguns dos efeitos deletérios da crioconservação na viabilidade de gametas. Espermatozóides têm alta concentração de ácidos graxos insaturados em suas membranas e não contém antioxidantes em quantidades significativas devido à redução de seu citoplasma (FOOTE et al., 2002). Devido a isto, os espermatozóides são extremamente suscetíveis à elevadas concentrações de oxigênio, que induzem a peroxidação de lipídios da membrana (JONES et al., 1973; MAC LEOD et al., 1943). Os efeitos das ROS no espermatozóide têm sido associados à perda de motilidade (IWASAKI et al., 1992), modificação do citoesqueleto (HINDSHAW, 1986), diminuição da produção de ATP (DE LAMIRANDE et al., 1992), inibição da interação oócito-espermatozóide (AITKEN et al.,

1993) e perturbações da integridade genômica (AITKEN et al., 1998). Devido a estes efeitos deletérios, muitos trabalhos têm recomendado a adição de antioxidantes no diluidor de sêmen para fins de congelação.

Baseado neste levantamento bibliográfico nota-se que o estresse oxidativo é um importante fator a ser controlado nos sistemas de PIV de embriões bovinos, uma vez que promove efeitos deletérios nos oócitos e embriões e, no espermatozóide, parece ter efeito estimulador ou inibidor, dependendo do parâmetro analisado ou da metodologia empregada no estudo.

Tomando-se por parâmetro a comparação com os eventos que ocorrem durante a fecundação *in vivo*, deve-se ter em mente que os ovidutos servem como “reservatório” de espermatozóides, sendo que neste local ocorrem à seleção do gameta masculino e a fecundação do oócito (IGNOTZ et al., 2001; SUAREZ et al., 1997). Recentemente, foi identificada a presença de muitos antioxidantes no fluido da tuba, como por exemplo, GSH, transferrina, albumina, catalase, aminoácidos antioxidantes (triptofano, cisteína, tironina, homocisteína) e enzimas da família das glutaciona-peroxidases (GUÉRIN et al., 2001; LAPOINT et al., 2003). Este achado tem importância fisiológica relevante, já que a maturação final do oócito, capacitação do espermatozóide, reação acrossomal, fecundação e desenvolvimento embrionário inicial ocorrem na tuba (GRIPPO et al., 1995). Baseado nestas informações de literatura observamos a necessidade de dar maior atenção aos antioxidantes como fatores para melhorar a fecundação *in vitro*.

A compreensão exata das necessidades metabólicas do oócito e do espermatozóide em sistemas de produção de embriões *in vitro* pressupõe a necessidade de novas pesquisas até que seja estabelecida a condição ideal para que o maior número possível de oócitos maturados *in vitro* possam ser fecundados e sustentem o subsequente desenvolvimento do embrião. Com este intuito, este trabalho buscou acrescentar informações referentes às necessidades metabólicas e/ou fisiológicas do oócito e do espermatozóide

durante o processo de fecundação para que, baseado nestas necessidades, seja possível a definição de um sistema de cultivo que aumente a produção *in vitro* de embriões bovinos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Com o intuito de melhorar os resultados da produção *in vitro* de embriões, este trabalho teve por objetivo principal avaliar os efeitos da suplementação do meio de fecundação *in vitro* com antioxidantes sobre a integridade das membranas espermáticas, fecundação, qualidade dos zigotos e competência no desenvolvimento de embriões bovinos.

2.2 Objetivos específicos

- 2.2.1 Avaliar o efeito da suplementação do meio de fecundação com antioxidantes (2-mercaptoetanol ou cisteamina), inibidor da síntese de glutathione (*DL- Bultionine Sulfoximine*-BSO) e heparina sobre a competência oocitária, fecundação e competência do desenvolvimento embrionário *in vitro*.
- 2.2.2 Avaliar o efeito da suplementação do meio de fecundação com antioxidantes sobre a integridade de membranas plasmática e acrossomal, potencial mitocondrial e variabilidade da frequência de danos no DNA.
- 2.2.3 Estabelecer relações entre os parâmetros avaliados no espermatozóide (integridade de membrana, integridade do acrossomo, potencial mitocondrial e danos no DNA) e taxas de fecundação e de desenvolvimento de embriões até o estágio de blastocisto.

3 HIPÓTESES

- 3.1 A adição de antioxidantes, BSO e heparina ao meio de fecundação diminui o estresse oxidativo e mantém a competência adquirida pelo oócito para o desenvolvimento embrionário *in vitro*.
- 3.2 A adição de antioxidantes, BSO e heparina ao meio de fecundação melhora a qualidade dos embriões produzidos *in vitro*.
- 3.3 A integridade de membrana do espermatozóide, reação acrossomal, potencial mitocondrial e variabilidade da frequência de danos no DNA tem relação positiva com a fecundação e com o desenvolvimento embrionário *in vitro*.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Maturação *In Vitro*

Desde que a fertilização *in vitro* (FIV) tornou-se uma realidade, tem-se dado crescente atenção ao conhecimento acerca dos eventos fisiológicos em períodos críticos do desenvolvimento do gameta feminino, como crescimento do folículo e do oócito e sua maturação (MINGOTI, 2000).

Os oócitos de mamíferos entram em prófase da primeira divisão meiótica nos estágios mais tardios do desenvolvimento fetal, sendo que os oócitos primários permanecem no estágio diplóteno da prófase I, desde o período próximo ao nascimento até algumas horas que antecedem a ovulação (BORUM, 1961). Gwatkin (1977) observou que o núcleo do oócito primário se mantém em diplóteno, período quiescente usualmente referido como estágio dictióteno, desde o nascimento até a puberdade. O núcleo dictióteno, caracterizado pela vesícula germinativa (GV). A retomada da meiose *in vivo* está sob regulação hormonal (BAKER, 1972) enquanto que *in vitro*, oócitos imaturos de várias espécies sofrem maturação espontânea quando são removidos dos folículos antrais e cultivados em meio apropriado (THIBAULT, 1977).

A maturação do oócito é conceitualmente dividida em processo nuclear e citoplasmático, bem como envolve mudanças nas células do *cumulus*. A maturação nuclear é iniciada pela retomada da meiose a partir da prófase I, com subsequente quebra da vesícula germinativa (GVBD) e progressão para metáfase II (M II). Entre 20 e 24 horas após o início do cultivo ocorre a completa maturação nuclear que é marcada pela expulsão do primeiro corpúsculo polar e formação da segunda placa metafásica. Nesta fase, o oócito passa a ser denominado oócito secundário.

Durante a maturação citoplasmática, os oócitos acumulam fatores maternos essenciais e se submetem às modificações genéticas que os tornam aptos para a fertilização e embriogênese (EPPIG et al., 1994; EPPIG et al., 1996). Isto demonstra a importância de fatores intrínsecos ao

oócito na viabilidade nuclear e citoplasmática para a competência meiótica e posterior desenvolvimento embrionário (VAN DEN HURK et al., 2003). Ocorrem ainda mudanças na síntese protéica, migração e reorganização das organelas. Quando há a fecundação, os grânulos corticais sofrem exocitose e esse processo acarreta modificações na zona pelúcida que impedem a poliespermia. As células do *cumulus* também sofrem alterações, elas se expandem durante a maturação e perdem as comunicações intercelulares com o oócito, as quais são denominadas “gap junctions” (HYTTEL, 1988).

A cinética da maturação foi demonstrada por Hyttel et al., (1987), que descreveram a ocorrência da ruptura da vesícula germinativa entre 6 e 12 horas após o início da maturação *in vitro*. A partir das 18 horas de cultivo, os cromossomos estão dispostos em metáfase I e após 21 a 30 horas, encontram-se em M II. O oócito secundário fica estagnado nessa fase até que ocorra sua ativação pela penetração espermática. Atualmente, considerando os oócitos que atingem a M II, os índices de maturação variam entre 80 a 90%.

Muitos fatores atuam sobre o oócito imaturo para que este se torne apto para a fertilização normal e que se desenvolva num embrião viável. A maturação inadequada, seja do núcleo ou do citoplasma, inviabiliza a fecundação e aumenta as ocorrências de poliespermia, de partenogênese e de bloqueio do desenvolvimento embrionário (MINGOTI, 2000).

O meio de cultura empregado na MIV deve proporcionar aos oócitos bovinos não somente a capacidade de alcançar a M II e de ser fecundado, como também influenciar o desenvolvimento embrionário subsequente (BAVISTER et al., 1992). No sistema mais comumente empregado para a PIV de embriões bovinos, a incubação ocorre a uma temperatura entre 38-39°C, pH entre 7,2-7,4 em 5% CO₂ em ar atmosférico com umidade saturada (GREVE; MADISON, 1991).

A suplementação dos meios de cultura com antioxidantes durante a MIV e CIV demonstrou melhorar as taxas de desenvolvimento de embriões

bovinos (ALI et al., 2002). A adição de cisteamina (Cist) ao meio de maturação provocou um efeito benéfico para o subsequente desenvolvimento dos embriões da espécie bovina (DE MATOS et al., 1995).

4.2 Fecundação *In Vitro* e Fertilidade

A fertilização é um processo complexo que resulta da união de dois gametas, promovendo a restauração do número de cromossomos para o começo do desenvolvimento de um novo indivíduo (GORDON, 1994). A base do processo de fertilização começa quando os espermatozoides se ligam a receptores da zona pelúcida (ZP) de oócitos. Os espermatozoides possuem um grande número de zonas de aderência protéicas na sua superfície que se ligam a receptores do oócito e essa aderência geralmente é espécie-específica. Após a interação do espermatozoide com o oócito ocorre a ativação, evidenciada na maioria dos mamíferos pela excitose dos grânulos corticais e retomada da meiose. O núcleo espermático se descondensa e transforma-se no pronúcleo masculino. O pronúcleo migra para o centro do oócito, o envelope nuclear se desintegra e ocorre a associação dos cromossomos para a primeira divisão mitótica, a clivagem, iniciando o desenvolvimento embrionário por sucessivas divisões e alterações morfológicas para a formação de mórulas e blastocistos (YANAGIMACHI, 1994). O êxito da fertilização *in vitro* em bovinos requer preparação apropriada tanto para o sêmen quanto para o oócito, bem como condições que favoreçam a atividade metabólica dos gametas feminino e masculino (BRACKETT, 1981).

Na fecundação *in vivo*, o espermatozoide está designado a passar pelo trato reprodutivo da fêmea, submeter-se à capacitação, alcançar a zona pelúcida, penetrar o oócito e, finalmente, acrescentar o conjunto de cromossomos haplóides normais para o oócito (FOOTE, 2002).

A capacitação prepara o espermatozoide para interagir com o oócito. Das estruturas do espermatozoide, a membrana plasmática é a que mais sofre mudanças durante a capacitação. A maioria destas mudanças culmina

com a ativação e desestabilização da membrana, o que habilita o espermatozóide para reação acrossomal. O conteúdo do acrossoma é liberado durante a reação acrossomal. Este evento é um pré-requisito para o sucesso da fertilização e ocorre quando o espermatozóide liga-se à ZP do oócito. Neste momento ocorre fusão e vesiculação da membrana plasmática com a membrana acrossomal e a exocitose do conteúdo acrossomal. Sem este evento não há penetração na zona pelúcida e fecundação do oócito. Somente o espermatozóide capacitado é capaz de sofrer a reação acrossomal (RAMALHO, 1999).

Muitos testes de motilidade espermática, morfologia e metabolismo tem sido correlacionados com a fertilidade (LARSSON; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000). A motilidade espermática é mais amplamente utilizada nos testes porque pode ser feita rapidamente. A morfologia espermática (HOUGH et al., 2002), particularmente a condição acrossomal (YANAGIMACHI; NEILL, 1994), é um importante indicador de fertilidade. Estudos *in vitro* são valiosos mecanismos para avaliar a capacitação espermática, a reação acrossomal e a interação entre espermatozóide e zona pelúcida (BENOFF et al., 1996; KOPF, 1998; YANAGIMACHI 1994). Vários tipos de defeitos das organelas do espermatozóide e de DNA podem ser detectados por um grande número de testes imunológicos e de citometria de fluxo (EVENSON et al., 1980; EVENSON et al., 2002; THOMAS et al., 1998).

4.3 Desenvolvimento Embrionário

O cultivo de embriões *in vitro* de animais de produção requer um ambiente apropriado para que embriões em estágios iniciais de desenvolvimento possam ter várias divisões por clivagem e serem capazes de atingirem o estágio de blastocisto (GORDON, 1994).

Vários estágios iniciais de desenvolvimento embrionário bovino têm sido descritos *in vivo*, sendo que a primeira clivagem ocorre cerca de 30 horas depois da fecundação e a segunda 10-12 horas após a primeira

clivagem (HAMILTON; LAING, 1946; LAING, 1949 apud GORDON, 1994). Trabalhos com MIV/FIV em bovinos descreveu picos de clivagem de 2, 4, 8 e 16 células emergindo 36, 42, 60 e 102 após inseminação (hpi) (VAN SOOM et al., 1992 apud GORDON, 1994). Um importante estágio no desenvolvimento embrionário é o tempo que ocorre a compactação e conseqüentemente, a formação da blastocela. Este evento preliminar é de grande importância para formação do trofotoderma (TF) e da massa celular interna (MCI), bem como para o desenvolvimento da cavidade da blastocela (GORDON, 1994).

Em todo sistema de cultura *in vitro*, o maior estresse é o aumento dos danos oxidativos com surgimento das espécies reativas ao oxigênio (ROS) (GOTO et al., 1993). Durante o cultivo *in vitro* de embriões de camundongos o efeito das ROS assume importante papel no desenvolvimento embrionário (ORSI; LEESE, 2001).

O estresse oxidativo parece ser responsável por numerosos tipos de danos ao embrião (GUÉRIN et al., 2001). As ROS, como O_2^- , são capazes de se difundir e passar pelas membranas celulares e alterar tipos de moléculas celulares como lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos. As conseqüências são múltiplas e incluem alterações mitocondriais, bloqueio embrionário, depleção do ATP e apoptose (morte celular programada) (GUÉRIN et al., 2001).

Organismos aeróbicos possuem mecanismos de proteção como a glutathione (GSH) sistema peroxidase/reductase (MEISTER; TATE, 1976). A GSH é um tripeptídeo thiol o qual tem um papel importante na fisiologia e metabolismo intracelular. Um dos mais importantes papéis da GSH é a manutenção do "status" redox na célula, protegendo-a contra os efeitos negativos das injúrias do estresse oxidativo. A síntese de GSH é altamente dependente da disponibilidade de cisteína no meio (ISHII et al., 1981; RATHBUN et al., 1991). A GSH parece ser o principal sistema de defesa não enzimático contra as ROS no embrião (TAKAHASHI et al., 1993). A GSH tem um importante papel na redução das ROS no ambiente dos

oócitos e embriões, e também na produção de um substrato, a glutathiona peroxidase (GPX), uma importante enzima antioxidante. A concentração de GSH nos embriões bovinos é altamente correlacionada com os primeiros estágios de desenvolvimento e viabilidade após congelação (TAKAHASHI et al., 1993). A síntese de GSH tem sido descrita durante a maturação do oócito de camundongo, hamster, porcos e bovinos (YOSHIDA et al., 1993). Este aumento na concentração de GSH promove ao oócito grande reservas de GSH disponível para a descondensação do núcleo do espermatozóide e também para proteger o embrião contra as ROS até o estágio de blastocisto (DE MATOS et al., 1995).

Danos ao DNA têm sido observados em embriões quando a síntese de GSH é inibida. A depleção de GSH causa um aumento nas concentrações de peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) bem como lesões no DNA de embriões bovinos (TAKAHASHI, 1993). Um aumento na produção de embriões bovinos *in vitro* tem sido observado com a suplementação de GSH (LUVONI et al., 1996).

Os antioxidantes do grupo thiol de baixo peso molecular, como a cisteamina (Cist) e o 2-mercaptoetanol (2-ME), quando presentes durante a MIV de oócitos bovinos e ovinos, estimulam a síntese de GSH e diminuem os níveis de H_2O_2 , levando a uma aumento do desenvolvimento embrionário (DE MATOS et al., 1996; 2002; DE MATOS; FURNUS, 2000).

Significativas concentrações de CSH têm sido detectadas no fluido folicular de vacas, porcas, cabras e cadelas (GUYADER-JOLY et al., 1998). A Cist. pode contribuir para a manutenção do “status” redox nos oócitos e a alta taxa de GSH/GSSG (glutathiona reduzida/glutathiona oxidada) que é importante para a função da glutathiona peroxidase (GPX). A CSH aumenta o desenvolvimento *in vitro* de oócitos suínos maturados e fertilizados *in vitro* (GRUPEN et al., 1995). Quando a Cist. foi adicionada ao meio de maturação, um efeito benéfico no subsequente desenvolvimento embrionário de bovinos e algumas espécies de suínos foi observado (GUPEN et al., 1995). No entanto, Guyarder-Joly et al. (1998),

apresentaram resultados indicando que a suplementação de Cist. no meio de maturação ou de cultivo, na mesma concentração, não induziu nenhum aumento no desenvolvimento embrionário no sistema de cultivo *in vitro*.

Várias investigações têm revelado que o efeito do 2-ME na maturação de oócitos e desenvolvimento embrionário tem sido correlacionada com a biosíntese intracelular de GSH (TAKAHASHI et al, 1993). Takahashi et al. (2002) testaram o efeito promotor de crescimento do 2-ME, pela dosagem de cistina nos diferentes estágios de desenvolvimento embrionário. A cistina é um importante aminoácido presente na síntese de GSH intracelular. Eles verificaram que os níveis de cistina foram baixos em cada estágio de desenvolvimento embrionário quando estes foram incubados sem 2-ME. No entanto, a adição de 2-ME promoveu um aumento nos níveis de cistina em todos os estágios de desenvolvimento embrionário. Contudo, esse aumento de cistina pôde ser inibido quando se adicionou *buthionine sulfoximine* (BSO), um inibidor da síntese de GSH.

Um passo limitante na síntese de GSH é a reação catalizada pela γ -glutamilcisteína sintetase. A influência da síntese de GSH intracelular no desenvolvimento embrionário foi suportada pelo achado de que o BSO (específico inibidor da γ -glutamilcisteína sintetase) neutraliza o efeito promovido pelos compostos thiol no desenvolvimento de oócitos e embriões bovinos (DE MATOS et al., 2002; GRIFFITH; MEISTER, 1989).

Grande quantidade de taurina e hipotaurina estão presentes nos gametas e no ambiente dos embriões em todas as espécies (GUÉRIN; MÉNÉZO, 1995). Estes compostos são sintetizados e secretados pelas células epiteliais do oviduto (GUÉRIN et al., 1995a). A hipotaurina neutraliza os radicais hidroxila e previne a peroxidação lipídica no espermatozóide (ALVAREZ; STOREY, 1983). A hipotaurina no fluido genital desempenha uma importante função de antioxidante para gametas e embriões. Um importante subproduto da hipotaurina, depois de sua ação sobre os radicais livres é a taurina (GUÉRIN et al., 2001). A taurina possui um efeito antioxidante indireto: contribui para limitar os efeitos deletérios das ROS

neutralizando aldeídos citotóxicos e produtos finais da cascata da reação de peroxidação (OGASAWARA et al., 1993).

O piruvato tem um importante papel tanto na energia do metabolismo primário quanto no potencial redox. Uma possível função para o piruvato na proteção de embriões contra o estresse oxidativo foi sugerida (O'FALLON; WRIGHT, 1995). O piruvato pode ser secretado por algumas células e pode funcionar como um antioxidante extracelular (O'DONNELL-TORMEY et al., 1987). O piruvato previne injúrias induzidas pelos peróxidos em embriões bovinos cultivados *in vitro* (MORALES et al., 1999) e quando associado ao lactato e adicionado ao meio de cultivo, previne os efeitos das ROS sobre espermatozóides humanos (DE LAMIRANDE; GAGNON, 1992).

4.4 Antioxidantes

Antioxidante tem sido definido como qualquer substância que estando presente em baixas quantidades quando comparada com substratos oxidáveis, atrasa ou inibe significativamente a oxidação desse substrato (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

Numerosos compostos têm funções antioxidantes, incluindo vitaminas A, C e E, e também piruvatos. Compostos sulfúricos são de particular interesse e incluem GSH, hipotaurina, taurina e Cist. GSH é um antioxidante natural presente em ambos os gametas, mas em níveis variáveis. Um aumento nas concentrações intracelulares de GSH é mostrado em oócitos que progridem da fase de GV para M II, mas a GSH é baixa em oócitos fecundados no estágio pró-nuclear quando comparados com oócitos maduros (CALVIN et al., 1986; PERREAULT et al., 1988; FUNAHASHI et al., 1995; MIYAMURA et al., 1995). Entretanto, a GSH possui um importante papel na proteção da célula contra os danos oxidativos (DE MATOS; FURNUS, 2000). Os níveis de GSH encontrados no oócito no final da maturação são considerados bons marcadores bioquímicos da viabilidade oocitária (ABEYDEERA et al., 1998).

O metabolismo do embrião e/ou estruturas ao seu redor, bem como vários fatores exógenos e condições de cultura podem aumentar a produção de ROS nos embriões. As espécies reativas de oxigênio ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot}) duram pouco, mas as suas interações iniciam eventos que são auto-programados e que aconteceriam em momentos finais, como a apoptose (BEHRMAN et al., 2001). Tem sido demonstrado que as ROS induzem disfunção mitocondrial, danos ao DNA, RNA e proteínas (COMPORTI, 1989), bem como inibição da fusão espermatozóide-oócito (AITKEN et al., 1993).

A proteção externa presente nos fluidos folicular e tubário compreende principalmente antioxidantes não enzimáticos como a hipotaurina, taurina e ácido ascórbico. Significativas amostras de Cist. foram detectadas no fluido folicular de vaca, porca, cabra e cadela (GUYADER-FOLY et al., 1998). A Cist. protege as células contra radiação ionizante e sabe-se também que ela ataca o OH^{\cdot} (ZHENG et al., 1988). Baseado nestes achados, recentemente tem-se aumentado a atenção sobre o estudo dos efeitos dos antioxidantes adicionados aos sistemas de PIV de embriões de bovinos. De Matos et al., (1995; 1996) demonstraram que a suplementação do meio de MIV com cisteamina aumentou o conteúdo intracelular de GSH em oócitos bovinos e melhorou o desenvolvimento e qualidade dos embriões, produzindo mais embriões que atingiram o estágio de blastocisto no dia 6 do que embriões produzidos em meio de maturação sem suplementação. A adição de CSH e cisteína no meio de maturação aumentou a síntese de GSH de oócitos bovinos durante a maturação *in vitro* (DE MATOS et al., 1995). A proteção interna compreende principalmente enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), glutaciona-peroxidase e γ -glutamylase sintetase.

Com relação aos efeitos dos antioxidantes exercidos sobre o espermatozóide, foi demonstrado que a adição de catalase, GSH, taurina, SOD e outros antioxidantes ajudaram a manter a motilidade espermática (BILODEAU et al., 2001). A transferrina pode neutralizar íons metálicos,

enquanto que a albumina previne a peroxidação lipídica no espermatozóide de numerosos compostos que bloqueiam a peroxidação como as lipoperoxidases (ALVAREZ; STOREY, 1983). A suplementação do meio de cultivo em cada uma das etapas da PIV (MIV, FIV e CIV) com antioxidantes metabolizáveis ou enzimáticos extracelulares poderá mostrar quando e como a proteção contra radicais livres é necessária (ALI et al., 2002).

4.5 Estrutura do Espermatozóide

Os espermatozóides são formados nos túbulos seminíferos dos testículos sendo o produto final do processo de gametogênese no macho (KNOBIL; NEILL, 1993). A produção de espermatozóides no touro (espermatogênese) é um processo lento onde a espermatogônia (célula precursora) se divide por mitose para a manutenção do seu número e de maneira cíclica produz espermatócitos primários. Estes se dividirão por meiose para produzir espermátides haplóides que se diferenciarão em espermatozóides que serão liberados no lúmen dos túbulos seminíferos (GORDON, 1994).

Os espermatozóides de touros são pequenos, células altamente condensadas que apresentam o volume muito inferior ao do oócito bovino (GORDON, 1994). Nos mamíferos, o espermatozóide possui duas estruturas principais, a cabeça e o flagelo ou cauda, que são unidos pelo colo ((KNOBIL; NEILL, 1993)).

Segundo Celeghini (2005), toda a característica estrutural especializada do espermatozóide está voltada para sua atividade funcional única, ou seja, assegurar a liberação do material genético contido no núcleo do espermatozóide para o oócito, onde a união dos pronúcleos masculino e feminino ocorre produzindo o zigoto (EDDY; O'BRIEN, 1994). Dessa forma, a função principal da cabeça do espermatozóide é a liberação de uma série haplóide de cromossomos para o oócito; enquanto, a do flagelo é promover motilidade à célula para permitir sua passagem pelo trato reprodutivo feminino e penetração através da zona pelúcida do oócito (MORTIMER,

1997). Para adquirirem essas habilidades os espermatozóides necessitam passar pelo processo de capacitação espermática, que *in vivo* ocorre no trato genital da fêmea, e de reação acrossomal.

Na capacitação ocorre uma complexa série de mudanças bioquímicas e reações fisiológicas que envolvem a remoção e alteração de componentes derivados dos túbulos seminíferos, epidídimo, *vas deferens* e plasma seminal, que são adsorvidos pela membrana plasmática do espermatozóide (GORDON, 1994). Assim, quando os gametas são expostos ao plasma seminal no momento da ejaculação, a superfície do espermatozóide fica recoberta por camadas de glicoproteínas secretadas no epidídimo. A remoção ou alteração dessas camadas permite a exposição de sítios de receptores fazendo os espermatozóides interagirem especificamente com receptores dos oócitos situados na zona pelúcida permitindo a reação acrossomal (GORDON, 1994).

4.5.1 Cabeça

A cabeça do espermatozóide contém o acrossomo, núcleo e uma pequena quantidade de estruturas de citoesqueleto e citoplasma (KNOBIL; NEILL, 1993).

O núcleo possui apenas um membro de cada par de cromossomos, e a cromatina é altamente condensada, sendo envolvido pelo envelope nuclear (KNOBIL; NEILL, 1993).

O acrossomo é uma vesícula grande, que está localizado na extremidade anterior da cabeça, entre o lado interno da membrana plasmática e o núcleo. Origina-se no Complexo de Golgi na espermátide e está envolvido por uma membrana que contém enzimas hidrolíticas necessárias para a penetração do espermatozóide através da matriz extracelular do oócito (zona pelúcida) para completar a fertilização (KNOBIL; NEILL, 1993).

Celeghini (2005) descreveu que o acrossomo possui uma membrana acrossomal interna e uma membrana acrossomal externa. A membrana

acrossomal interna fica em contato com a membrana nuclear; enquanto, a membrana acrossomal externa está em contato com o lado interno da membrana plasmática. Ele consiste de dois segmentos, a capa acrossomal (acrossomo anterior) e o segmento equatorial (acrossomo posterior). No processo de reação acrossomal, a membrana externa do acrossomo e a membrana plasmática se fundem e formam vesículas liberando o conteúdo acrossomal. A membrana acrossomal interna e o segmento equatorial persiste até a fusão do espermatozóide com o oócito (EDDY; O'BRIEN, 1994; FLESH; GADELLA, 2000; ÔURA; TOSHIMORI, 1990). Múltiplas enzimas estão presentes no acrossomo como acrosina, β -N-acetilglicosaminidase, fosfatase ácida, arilamidase, arissulfatase A, aspartilamidase, calpaína II, peptidase semelhante à catepsina D, peptidase semelhante à colagenase, peptidase dipeptidil, esterases não específicas, β -galactosidase, hialuronidase, fosfolipase A2 e fosfolipases C (EDDY; O'BRIEN, 1994). O conteúdo acrossomal é liberado por exocitose mediada por cálcio, durante a reação acrossômica. Após a descarga e ativação das enzimas acrossomais o espermatozóide penetra a zona pelúcida que rodeia o oócito, um processo que pode ser bloqueado por inibidores de proteases (EDDY; O'BRIEN, 1994; ÔURA; TOSHIMORI, 1990).

4.5.2 Flagelo

O flagelo é composto pela peça intermediária, peça principal e peça terminal C.

Na porção interna o flagelo é constituído pelo axonema, uma estrutura especializada do citoesqueleto, responsável pela motilidade espermática. É formado por nove microtúbulos duplos localizados na periferia do cilindro e por dois microtúbulos simples centrais (COSSON, 1996; EDDY; O'BRIEN, 1994; ÔURA; TOSHIMORI, 1990).

A peça intermediária se estende do colo até o *anulus*, onde se conecta com a peça principal. Ela contém um arranjo helicoidal de mitocôndrias, as

quais geram energia para o batimento flagelar (MORTIMER, 1997; ÔURA e TOSHIMORI, 1990).

A função fisiológica principal das mitocôndrias nas células vivas, relatada por Celeghini (2005) é realizar a fosforilação oxidativa e produzir ATP como origem de energia metabólica (BEREITER-HAHN, 1990; ERNSTER; SCHATZ, 1981; FREY; MANNELLA, 2000). A membrana mitocondrial interna é o local de produção de energia, sendo essencial para a suplementação de ATP para o batimento flagelar (ERNSTER; SCHATZ, 1981; MORTIMER, 1997).

A peça principal do flagelo se estende do *anulus* até a peça terminal e é caracterizada pela presença da bainha fibrosa. A bainha fibrosa é uma estrutura do citoesqueleto que rodeia o axonema e as fibras densas externas, fornecendo um suporte no controle e restrição do movimento flagelar. A peça terminal contém somente o axonema coberto pela membrana plasmática (EDDY e O'BRIEN, 1994; MORTIMER, 1997; ÔURA e TOSHIMORI, 1990).

O flagelo promove a motilidade e força necessária para o espermatozóide atingir a superfície do oócito e realizar a fecundação. Os diferentes elementos do flagelo geram e formam ondas que produzem esta força e propagam essas ondas da base para a ponta da cauda do espermatozóide (KNOBIL; NEILL, 1993).

4.5.3 Membranas Espermáticas

As membranas (plasmática, nuclear, acrossomal e mitocondrial) da célula espermática são agregados de lipídios e proteínas construídas durante a espermatogênese e modificadas durante o trânsito e armazenamento no epidídimo e ejaculação. A função das membranas é determinada pela interação de seus vários componentes; desse modo, algum evento que modifique estas interações pode alterar sua função (FLESCHE; GADELLA, 2000; HAMMERSTEDT et al., 1990; ÔURA e TOSHIMORI, 1990).

Na célula espermática matura pode-se identificar três regiões altamente especializadas da membrana plasmática: a cabeça do espermatozóide, envolvida na interação espermatozóide-oócito; a peça intermediária, que contém mitocôndrias envolvidas na produção de energia; e o flagelo, envolvido na motilidade (FLESCHE; GADELLA, 2000).

Celeghini (2005) citou que na cabeça do espermatozóide, a membrana plasmática possui duas estruturas: região acrossomal e região pós-acrossomal. Na região acrossomal a membrana plasmática pode ser subdividida em segmento marginal (apical), segmento principal (acrossomal) e segmento equatorial. Os segmentos marginal e principal, juntos, são denominados de capa acrossomal. A membrana plasmática do flagelo é separada em domínio da peça intermediária, que cobre a bainha mitocondrial, e domínio da cauda posterior, que cobre a peça principal e terminal da cauda (EDDY; O'BRIEN, 1994). A membrana plasmática da cabeça do espermatozóide é separada da membrana plasmática da peça intermediária pelo anel posterior, o qual é separado da membrana plasmática do flagelo pelo anel anular. Estas estruturas diferentes contêm concentrações e distribuições de partículas intra-membranas variadas (FLESCHE; GADELLA, 2000).

4.6 Uso de Sondas Fluorescentes para Avaliação Espermática

Há muitos anos, tem sido investigado o desenvolvimento de ensaios laboratoriais para prever com acurácia a capacidade fertilizante do sêmen. No entanto, nenhum teste laboratorial isolado pode estimar o potencial de fertilidade do sêmen, uma vez que, para ser capaz de fertilizar o oócito e permitir o desenvolvimento embrionário, os espermatozóides precisam apresentar diversos atributos (ARRUDA, 2000; ARRUDA et al., 2003; BRAUNDMEIER, 1997; GRAHAM et al., 1990). O sêmen deve apresentar características mínimas de concentração, motilidade e características morfológicas dos espermatozóides, parâmetros clássicos na avaliação de amostras de sêmen para garantir a fertilidade.

Uma grande diversidade de biotécnicas vem sendo desenvolvida para avaliação seminal, das quais se pode citar sistema de avaliação computadorizado das características seminais, o uso de sondas fluorescentes para a avaliação das estruturas espermáticas por microscopia de epifluorescência ou sistema de citometria de fluxo, técnicas de sexagem espermática, testes hiposmóticos, avaliação de proteínas do plasma seminal, produção de espécies reativas de ao oxigênio, entre outras (ARRUDA et al., 2003; ARRUDA et al., 2004; CELEGHINI, 2005).

A fluorescência é um indicador sensível e específico do estado de certas moléculas (oxidadas x reduzidas, ionizadas x não ionizadas, livres x não ligadas), podendo ser aplicadas como um meio de medir mudanças metabólicas dentro de células vivas (HAUGLAND, 2001).

O emprego das sondas fluorescentes na andrologia busca avaliar integridade e função de compartimentos específicos de células espermáticas (HALANGK, 1984; PETERSON et al., 1974).

4.6.1 Avaliação das Membranas Espermáticas

Celeghini (2005) mencionou que a membrana plasmática é responsável pelo mecanismo de manutenção do equilíbrio osmótico, atuando como uma barreira entre os meios intra e extracelulares. Danos nesta estruturas podem levar a perda da homeostase com posterior morte da célula (AMANN; PICKETT, 1987). Assim, a integridade da membrana plasmática exerce papel fundamental para a sobrevivência do espermatozóide no trato genital da fêmea e para a manutenção de sua capacidade fertilizante (PARKS; GRAHAM, 1992).

Para a avaliação da integridade da membrana plasmática em espermatozóides, os primeiros estudos com o uso de corantes ou sondas fluorescentes citam o emprego do brometo de etídio para sêmen humano (PETERSON et al., 1974), de galos (BILGILI; RENDEN, 1984) e de touros (HALANGK, 1984).

Celeghini (2005) descreveu que devido à alta toxicidade do brometo de etídio, principalmente para quem o manipula, sua aplicação tem sido restringida. O iodeto de propídio (PI), um corante fluorescente com propriedades similares, passou a ser utilizado. Assim, a aplicação do PI como marcador da integridade da membrana plasmática vem sendo realizada mais amplamente por microscopia de epifluorescência (GARNER et al, 1997; SUKARDI et al., 1997; THOMAS et al., 1997). ou por citometria de fluxo. (GRAHAM et al., 1990; THOMAS et al., 1998). O PI possui afinidade ao DNA e cora em vermelho o núcleo de células com membrana plasmática lesada. Por ser um corante fluorescente muito estável, o PI vem sendo utilizado em uma grande quantidade de trabalhos, apresentando êxito nos resultados tanto em microscopia de epifluorescência quanto para citometria de fluxo (ARRUDA, 2000, ARRUDA et al, 2003a; BAYYARI et al., 1990; GARNER et al., 1986; GARNER et al., 1988; GRAHAM et al., 1990; MAXWELL et al., 1997).

4.6.2 Avaliação da Membrana do Acrossomo

A reação acrossômica, caracterizada pela liberação das enzimas acrossomais, é um evento essencial para a penetração do espermatozóide na zona pelúcida e fusão com a membrana plasmática do oócito (DIAZ-PERES et al., 1988). Portanto, a integridade do acrossomo, bem como a manutenção de suas enzimas, são cruciais para que ocorra a fertilização (FLESH e GADELLA, 2000; HAFEZ, 2004; ÖURA; TOSHIMORI, 1990).

Celeghini (2005) citou que as aglutininas, tais como aglutinina de *Pisum sativum* (PSA), aglutinina de *Ricinus communis* (RCA), aglutinina de *Arachis hypogea* (PNA) ou *Concanavalia ensiformis* (ConA) que possuem especificidade a glicoproteínas da membrana acrossomal, têm sido usadas para determinar a integridade acrossomal. Para a visualização do acrossomo espermático em microscopia de epifluorescência, estas aglutininas devem ser conjugadas a fluoresceínas, tais como o isotiocionato de fluoresceína (FITC) (FARLIN et al., 1992; HOLDEN et al., 1990). A PSA

é uma aglutinina da ervilha, que se liga aos glicoconjugados da matriz acrossomal (CROSS; MEIZEL, 1989), tem afinidade para as terminações α -D-glicosil e resíduos α -D-manosil de glicoproteínas, se ligando especificamente ao açúcar α -manosidade encontrado no conteúdo acrossomal (CROSS et al., 1986). Esta aglutinina, quando conjugada à isotiocianato de fluoresceína (FITC), marca com sucesso o acrossomo espermático em verde amarelado, facilita a visualização e identifica acrossomos lesados, podendo ser aplicado aos espermatozóides humanos (CROSS et al., 1986; MENDONZA et al., 1992; TESARIK et al., 1993), bovinos (GRAHAM et al., 1990), eqüinos (ARRUDA, 2000; ARRUDA et al., 2003a; CASEY et al., 1993; FARLIN et al., 1992) e suínos (MATTIOLI et al., 1996).

4.6.3 Avaliação da Função Mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial que é gerado pela cadeia respiratória coordena a síntese de ATP na mitocôndria. A capacidade para monitorar mudanças no potencial de membrana em mitocôndrias *in situ* dentro de células pode ser crucial para a interpretação de mudanças na fisiologia celular em várias situações experimentais (DUCHEN et al., 1993).

As mitocôndrias estão dispostas de forma helicoidal na peça intermediária das células espermáticas, sendo que o ATP produzido é um suplemento energético para os batimentos flagelares. Portanto, é indispensável que haja produção de ATP pelas mitocôndrias para haver motilidade espermática (COSSON, 1996).

Celeghini (2005) descreveu que muitos indicadores para o monitoramento do potencial de membrana de mitocôndrias têm sido discutidos com grande ênfase em favor das sondas fluorescentes. Os componentes com sensibilidade ao potencial de membrana mitocondrial mais comuns são as rodaminas e as carbocianinas. O sucesso para o uso dessas sondas em células vivas é baseado no fato de não serem destrutivas nem causarem toxicidade (REERS et al., 1991).

Um tipo especial de multímeros de carbocianinas foi identificado primeiramente por Jelley (1937) e por isso foi chamado J-agregados (3,3'-dipentilthiodicarbocianina). Estes compostos tem sido utilizados para visualizar mitocôndrias em uma variedade de células, sendo o mais utilizado o corante identificado como sendo o iodeto de 5,5,6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) (REERS et al., 1991). O JC-1 identifica populações de mitocôndrias com diferentes potências de membrana através de códigos de cor. Sua cor é alterada do verde para o laranja ou vermelho, com aumento do potencial de membrana (COSSARIZZA et al., 1993; REERS et al., 1991). A fluorescência verde do JC-1 ocorre devido à formação de monômeros, apresentando excitação e emissão máximas de 510 e 527nm, respectivamente, enquanto a fluorescência vermelha do JC-1 é devido à formação de J-agregados, com excitação e emissão máximas de 485 e 585nm, respectivamente (HAUGLAND, 2001).

Para suporte no diagnóstico de infertilidade humana, como descreve Celeghini (2005), a sonda fluorescente JC-1 tem sido utilizada para identificar espermatozóide com baixo potencial de membrana mitocôndrial (TROIANO *et al.*, 1998). Pode detectar com acurácia mudanças no potencial de membrana de eqüinos (GRAVANCE et al., 2000) e murinos (GRAVANCE et al., 2001). Como também vem sendo empregada para avaliar os efeitos da criopreservação (GARNER et al., 1997; GARNER et al., 2001; THOMAS et al., 1988) e da adição do glicerol sobre a função da membrana mitocôndrial de espermatozoides bovinos (GARNER et al., 1999).

A adição do glicerol ao sêmen bovino mostrou uma diminuição do potencial de membrana, determinando pela diminuição da presença de J-agregados nos espermatozoides corados por JC-1 (GARNER et al., 1999).

4.6.4 Avaliação da Estrutura da Cromatina Espermática

É essencial que seja preservada integridade da cromatina para o desenvolvimento embrionário após a fertilização e união dos pró-núcleos feminino e masculino. Vários autores têm sugerido que espermatozóides que possuem núcleos irregulares apresentam cromatina com estrutura alterada e que essas alterações poderiam se detectadas por padrões anormais de desnaturação do DNA em testes específicos (EVENSON et al., 1980; FRASER, 2004; GLEDHILL et al., 1971; ROUX et al., 2004).

Células de morfologia irregular possuem seu DNA menos resistente à desnaturação térmica, contudo, em doadores subférteis, muitos espermatozóides normais também são anormalmente susceptíveis à desnaturação térmica de seu DNA, sendo que a sensibilidade da cromatina ao estresse térmico pode ser um determinante adicional da fertilidade. (EVENSON, 1980).

Segundo Celeghini (2005), a fragmentação do DNA genômico do espermatozóide pode ocorrer por ativação de endonucleases ou mediado por proteínas da superfície celular (DONNELLY et al., 2000). A quebra na fita de DNA pode ser detectada pela técnica de TUNEL (BACCETTI et al., 1999; DONNELLY et al., 2000), pelo ensaio Cometa, por gel de eletroforese (DONNELLY et al., 2000; DUTY, 2000) e pela técnica de “Feulgen”, na qual mudanças nucleares após a congelação, em espermatozóides suínos, são detectadas por diferenças na intensidade do corante (HAMAMAH et al., 1990). Ainda, a avaliação da estrutura da acromatina espermática tem sido realizada com o uso da acridina laranja, um corante fluorescente que intercala à dupla fita do DNA e fluoresce em verde quando esta se apresenta íntegra, todavia, quando associada a uma porção desnaturada da fita de DNA, ou quando associada ao RNA, a acridina emite fluorescência laranja, permitindo a quantificação de desnaturação do DNA das células de uma amostra, podendo auxiliar na identificação de indivíduos portadores de distúrbios muito sensíveis ocorridos durante o processo da espermatogênese (FOSSA et al., 1997).

A coloração por acridina laranja foi desenvolvida para a avaliação de espermatozoides humanos (EVENSON et al., 1980; TEJADA et al., 1984) e adaptada para espermatozoides bovinos (UNANIAN, 2000). Este teste pode ser aplicado para controlar a qualidade do sêmen, para melhor entender certos tipos de infertilidade masculina, para checar a condição do sêmen usado na fertilização *in vitro* e para diagnosticar indivíduos que apresentem espermiogramas normais e fertilidade reduzida (TEJADA et al., 1984). A avaliação da integridade da cromatina pelo uso da técnica da acridina laranja tem sido utilizada para avaliar sêmen criopreservado de bovinos (BOCHENEK et al., 2001; ANZAR et al., 2002; JANUSKAUSKAS et al., 2003; JANUSKAUSKAS et al., 2001).

4.7 Associações de Sondas Fluorescentes

A associação de sondas fluorescentes vem sendo preconizada para uma avaliação total das células presentes em uma amostra. Ainda, as associações de sondas fluorescentes permitem avaliar simultaneamente mais do que um compartimento da célula espermática (CELEGHINI, 2004; 2005).

As células espermáticas possuem diferentes tipos de membrana (membrana plasmática, membrana acrossomal e membrana mitocondrial) e para manter a viabilidade dos espermatozoides a integridade dessas membranas tem que estar preservada (GRAHAM et al., 1990). Testes laboratoriais para avaliar isoladamente cada tipo de membrana não são efetivos para prever a fertilidade de amostras de sêmen (GRAHAM et al., 1990), contudo, a combinação de vários testes é a melhor forma de analisar a fertilidade do sêmen. Vários procedimentos têm sido usados para: a) diferenciar células vivas e mortas na habilidade da membrana plasmática em prevenir a entrada do corante dentro da célula; b) avaliar a integridade da membrana acrossomal (CROSS; MEIZEL, 1989); c) ou analisar ao mesmo tempo a viabilidade da célula e integridade acrossomal.

A integridade das membranas plasmática e acrossomal foi avaliada simultaneamente pela associação de PI e FITC-PSA em espermatozóides humanos (CENTOLA et al., 1990), ovinos (SUKARDI et al., 1997), eqüinos (ARRUDA, 2000; ARRUDA et al., 2003a) e bovinos (GRAHAM et al., 1990; WAY et al., 1995).

Uma técnica de avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial, que forneça informações mais precisas e acuradas sobre a qualidade seminal é de extrema importância (ARRUDA et al., 2004). Como em uma central de biotecnologia de sêmen um grande número de amostras deve ser processado e avaliado, esta técnica deve apresentar menor gasto de tempo e de custo para que sua aplicação seja rotineira.

5. REFERÊNCIAS ¹

ABEYDEERA, L.R.; WANG, W.H.; CANTLY, T.C.; PRATHER, R.S.; DAY, B.N. Presence of β -mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured *in vitro* and the rate of blastocyst development after *in vitro* fertilization. **Theriogenology**, v.50, p.747-756, 1998.

AITKEN, R.J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.98, p.257-265, 1993.

AITKEN, R.J.; GORDON, E.; HARKISS, D.; TWIGG, J.P.; MILNE, P. JENNINGS, Z.; IRVINE, D.S. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 1037-1046, 1998.

ALI, A.A.; BILODEAU, J.F.; SIRARD, M.A. Antioxidants requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. **Theriogenology**, v. 59, p. 939-949, 2002.

ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. **Biology of Reproduction**, v. 29, p. 548-555, 1983.

ANZAR, M.; HE, L.; BUHR, M.M.; KROETSCH, T.G.; PAULS, K.P. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 354-360, 2002.

ARRUDA, R.P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000. 121f. Tese (Livre Docência)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, 2000.

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C. Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozóides bovinos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 17, 2003, Beberibe, CE. **Anais...** Beberibe, CE: Acta Scientiae Veterinariae, v. 31, Suplemento, p. 230-231, 2003.

ARRUDA, R.P.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; LIU, I.K.M. Determinação da integridade da membrana plasmática e acrossomo de espermatozóides de garanhões pela técnica de citometria de fluxo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 17, 2003a, Beberibe, CE. **Anais....** Beberibe, CE: Acta Scientiae Veterinariae, v. 31 Suplemento, p. 226-227, 2003a.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR6023: informação e documentação, referência elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ANDRADE, A.F.C.; GARCIA, A.R.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; SOUZA, L.W.O. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA.1, 2004. Londrina, PR. **Anais...**, Londrina, PR. p. 166-179, 2004.

BAKER, T.G. Oogenesis and ovulation. In: **Reproduction in mammals: germs, cells and fertilization**. Cambridge: Cambridge University Press, 1972, v.1.

BAVISTER, B.D. A consistently successful procedure for *in vitro* fertilization of Golden Hamster eggs. **Gamete Research**, v.23, p.139-158, 1989.

BAVISTER, B.D., ROSE-HELLEKANT, T.A., PINYOPUMMINTR, T. Development of *in vitro* matured / *in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. **Theriogenology**, v.37, p. 127-146, 1992.

BEHRMAN, H.R., KODAMAN, P. H., PRESTON, S.L., GAO, S. Oxidative Stress and the ovary. **Journal of Society for Gynecologic Investigation**, v.8, p. 40-42, 2001.

BENOFF, S.; BARCIA, M.; HURLEY, I.R.; COOPER, G.W.; MANDEL, F.S.; HEYNER, S.; GARSIDE, W.T.; GILBERT, B.R.; HERSHAG, A. Classification of male factor infertility relevant to *in vitro* fertilization insemination strategies using mannose liquids, acrosome status and anti-cytoskeletal antibodies. **Human Reproduction**, v. 11, p. 1905-1918, 1996.

BILGILI, S.F.; RENDEN, J.A. Fluorimetric determination of avian sperm viability and concentration. **Poultry Science**, v. 63, n.11, p. 2275-2277, 1984.

BILODEAU, J.F.; CHATTERJEE, S.; SIZARD, M.A. Cryopreservation of bovine semen decreases antioxidant defenses in spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 60, n. 1, p. 102 ,1999. Abstract .

BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; GAGNON, C.; SIZARD, M.A. Thiols prevent H₂O₂- Mediated loss sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, v. 58, p. 275-288, 2001.

BRACKETT, B.G.; SEIDEL JUNIOR G.E.; SEIDEL, S.M. (Eds.). **Technologies in animal breeding**. New York, Academic Press, 1981.

BOCHENEK, M.; SMORAG, Z.; PILCH, J. Sperm chromatin structure assay qualified for artificial insemination. **Theriogenology**, v. 56, p. 557-567, 2001.

BORUM, K. Oogenesis in the mouse. A study of meiotic prophase. **Experimental Cell Research**, v. 24, p. 495-507, 1961.

BRAUNDMEIER, A.G.; MILLER, D.J. The search is on: finding accurate molecular markers of male fertility. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 1915-1925, 2001.

BRINKLEY, W.B.R. Microtubules: a brief historical perspective. **Journal Structural Biology**, v. 118, p. 84-86, 1997.

CALVIN, H.I.; GROSSHAN, K.; BLAKE, E.J. Estimation and manipulation of glutathione levels in prepuberal mouse ovaries and ova: relevance to sperm nucleus transformation in the fertilized egg. **Gamete Research**, v.14, p.265-275, 1986.

CELEGHINI, E.C.C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina utilizando sondas fluorescentes**. 2005 190f., Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; RAPHAEL, C.F.; NASCIMENTO, J. Simultaneous evaluation of the plasmatic, acrosomal and mitochondrial membranes in equine spermatozoa. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL, 15, 2004, Porto Seguro, BA. **Proceedings...** Porto seguro, BA, p.511, 2004

CENTOLA, G.M.; MATTOX, J.H.; BURDE, S.; LEARY, J.F. Assessment of the viability and acrosome status of fresh and frozen-thawed human spermatozoa using single-wavelength fluorescence microscopy. **Molecular Reproduction and Development**, v 27, n. 2, p. 130-135, 1990.

COMPORTI, M. Three models of free radical induced cell injury. **Chemico Biology Interaction**, v.72, p. 1-56, 1989.

COSSARIZZA, A.; BACCARANI-CONTRI, M.; KALASHNIKOVA, G.; FRANCESCHI, C. A new method for the cytometric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 197, n. 1, p. 40-45, 1993.

COSSON, J. A moving image of flagella: news and views on the mechanisms involved in axonemal beating. **Cell Biology International**, v. 20, n. 2, p. 83-94, 1996.

CROSS, N.L.; MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 635-641, 1989.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C.A. Reactive oxygen species and human spermatozoa. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. **Journal of Andrology**, v. 13, p. 368-378, 1992.

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 beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. **Theriogenology**, v.53, p.761-771, 2000.

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

DE MATOS, D.G., GASPARINE, B., PASQUALINI, S.R., THOMPSON, J.G. Effect of glutathione synthesis stimulation during *in vitro* maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. **Theriogenology**, v.57, p. 1443-1451, 2002.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C.; MOSES, D.F.; MARTINEZ, A.G.; MATKOVIC, M. Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. **Molecular Reproduction and Development**, v.45, p.451-457, 1996.

DIAZ-PERES, E.; THOMAS, P.; MEIZEL, S. Evidence suggesting a role for sperm methalloendoprotease activity in penetration of zone-free hamster eggs by human sperm. **Journal of Experimental Zoological**, v. 248, p. 213-221, 1988.

DUCHEN, M.R.; CROMPTON, M.; PEUCHEN, S.; NOWICKY, A. The use of a carbocyanin cells. **Journal of Physiology**, v. 473, p.7, 1993.

EDDY, E.M.; O'BRIEN, D.A. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press. 1994, cap. 2, p. 29-77.

EPPIG, J.; O'BRIEN, M.; WIGGLEWORTH, K. Mammalian oocyte growth and development *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v.44, p.260-273, 1996.

EPPIG, J.J.; SCHULTZ, R.M.; O'BRIEN, M.J.; CHESNEL, F. Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. **Developmental Biology**, v. 164, p. 1-9, 1994.

EVENSON, D.P.; DARZYNKIIEWICZ, Z.; MELAMED, M.R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. **Science**, v. 210, p. 1131-1133, 1980.

EVENSON, D.P.; LARSON, K.L.; JOST, L.K., Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male fertility and comparison with other techniques. **Journal of Andrology**, v. 23, p. 25-43, 2002.

FLESCH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1469, p. 197-235, 2000.

FOOTE, R. H.; BROCKETT, C.C.; KAPROTH, M.T. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v.71, p. 13-23, 2002.

FOWLER, C.J.; CALLINGHAM, B.A. Substrate-selective activation of rat liver mitochondrial monoamine oxidase by oxygen. **Biochemical Pharmacology**, v.2, p.1995-2000, 1978.

FUNAHASHI, H.; STUMPF, T.T.; CANTELY, T.C.; KIN, N.H.; DAY, B.N. Pronuclear formation and intracellular glutathione content of *in vitro* matured porcine oocytes following *in vitro* fertilization and/or electrical activation. **Zygote**, v.3, p.273-281, 1995.

FRASER, L. Structural damage to nuclear DNA in mammalian spermatozoa: its evaluation techniques and relationship with male infertility. **Polish Journal Veterinary Science**, v. 7, n. 4, p. 311-321, 2004.

GARNER, D.L.; THOMAS, A.C.; GRAVANCE, C.G. The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. **Reproduction in the Domestic Animal**, v. 34, p. 399-404, 1999.

GLEDHILL, B.L.; DARZYNKIEWICZ, Z.; INGERTZ, N. R. Changes in deoxyribonucleoprotein during spermiogenesis in the bull: increased [H]actinomycin D binding to nuclear chromatin of morphologically abnormal spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 26, p. 25, 1971.

GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. Cambridge: Cambridge University Press, 1994, p.30-142.

GOTO, Y.; NODA, Y.; MORI, T.; NAKANO, M. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured *in vitro*. **Free Radical Biology & Medicine**, v.15, p.69-75, 1993.

GRAHAM, J.K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 55-64, 1990.

GREVE, T.; MADISON, V. *In vitro* fertilization in cattle: a review. **Reproduction Nutrition Development**, v.31, n. 2, p. 147-157, 1991. Review.

GRIFFITH, O. W.; MEISTER, A. Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine) **Journal of Biology Chemistry**, v.254, p. 7558-7560, 1989.

GRIPPO, A.A.; WAY, A.L.; KILLIAN, G.J. Effect of bovine ampullary and isthmic oviductal fluid on motility, acrosome reaction and fertility of bull spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 105, p. 57-64, 1995.

GRUPENT, C.G.; NAGASHIMA, H.; NOTTLE, M.B. Cysteamine enhance *in vitro* development of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 153-157, 1995.

GUÉRIN, P.; MÉNÉZO, Y. Hypotaurine and taurine in gamete and embryo environments: synthesis via cistine sulfinic acid pathway in oviduct cell. **Zygote**, v.33, p. 333-343, 1995.

GUÉRIN, P.; MOUATASSIN, S.EL.; MÉNÉZO, Y. 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.

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

GWATKIN, R. B. L. **Fertilization mechanisms in a man and mammals**. New York, London: Plenum Press, 1977.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7.ed. São Paulo: Manole, 2004. 513 p.

HALANGK, W.; FRANK, K.; BOHNENSACK, R. Zur bestimmung der menge intakter spermien in bullenejakulaten. **Archiv Exper Vet med, Leipzig**, v. 38, n. 1, p. 105-114, 1984.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. Role of iron in oxygen radical reactions. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 47-56, 1984.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. The chemistry of oxygen radicals and other derived species. In: HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. (EDS). **Free radicals in biology and medicine**. 2nd. edn. Clarendon: Press, Oxford, 1989, p. 22-85.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammaliansperm: What we ask them to survive. **Journal of Andrology**, n.11, p. 73-88, 1990.

HAUGLAND, R.P. Handbook of fluorescent probes and research chemicals. Eugene, OR : **Molecular Porbes**, 2001.

HINDSHAW, D.B.; SKAL, L.A.; BOHL, B. Cytoskeletal and morphologic impact of cellular oxidant injury. **American Journal of Pathology**, v. 123, p. 454-416, 1986.

HOUGH, S.R.; KAPROTH, M.T.; FOOTE, R.H. Induction of the acrosome reaction and zone-free hamster oocyte penetration by a bull with complete teratospermia versus a half brother with normal sperm. **Journal of Andrology**, v. 23, p. 98-106, 2002.

HYTTEL, P.; XU, K.P.; CALLESEN, H.Y.; GREVE, T. Ultrastructure of the final nuclear maturation of bovine oocytes *in vitro*. **Anatotomy and Embriology**, v. 176, p. 35-40, 1987.

HYTTEL, P. **Oocyte maturation and fertilization in cattle: ultrastructural aspects**. 1988 118p. Thesis (Anatomy) - University. Department of Anatomy, Copenhagen, 1988.

IGNOTZ, G.G.; LO, M.C.; PEREZ, C.L.; GWATHMEY, T.M.; SUAREZ, S.S. Characterization of a fucose-binding protein from bull sperm and seminal plasma that may be responsible for formation of the oviductal sperm reservoir. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1806-1811, 2001.

IWASAKI, A.; GAGNON, C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. **Fertility and Sterility**, v. 57, p. 409-416, 1992.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. **Theriogenology**, v. 55, p. 947-961, 2001.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. **Theriogenology**, v. 60, p. 743-758, 2003.

JELLEY E.E . Molecular, nematic and crystal states of 1: 1 '-diethyl- ϕ -cyanine chloride. **Nature**, v.139, 631-632, 1937.

JONES, R., MANN, T. The effects of dilution , egg yolk and cooling to 5°C on the ultraestructure of ram spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 35, p. 311-320, 1973

KNOBIL, E., NEILL, J. D. **The Physiology of Reproduction**. 2^a Ed., New York: Raven Press, 1993, v. 2, p.29-79.

KOPF, G.S. Acrosome reaction. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. (EDS.). **Encyclopedia of reproduction**. New York: Academic Press, 1998, v. 1, p.17-26.

LAPOINTE, J.; BILODEAU, J.F. Antioxidant defenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 1157-1164, 2003.

LARSON. B.; RODRIQUEZ-MARTINEZ, H. Can we use *in vitro* fertilization tests to predict semen fertility? **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p.327-336, 2000.

LIU, Z.; FOOTE, R.H. Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O₂. **Biology of Reproduction**, v.53, p.786-790, 1995.

LUVONI, G.C.; KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B.G. Improvement of bovine embryo production *in vitro* by glutathione-containing medium. **Molecular Reproduction and Development**, v. 43, p. 437-443, 1996.

MAC LEOD, J. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. **American Journal of Physiology**, v. 138, p. 512-518, 1943.

MASTRIOANNI JUNIOR, L.; JONES, R. Oxygen tensions in the rabbit fallopian tube. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.9, p.99-102, 1965.

MINGOTI, G. Z. **Maturação oocitária associada a esteroidogênese: papel do soro sanguíneo, albumina sérica e hormônios esteróides**. 2000 141 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.

MEISTER, A.; TATE, S.S. Glutathione and the related γ -glutamyl compounds: biosyntheses and utilization. **Annual Review of Biochemistry**, v. 45, p. 559-604, 1976.

MIYAMURA, M.; YOSHIDA, M.; HAMANO, S.; KUWAYAMA, M. Glutathione concentration during maturation and fertilization in bovine oocytes. **Theriogenology**, v.43, p.282, 1995. Abstract.

MORALES, H.; TILQUIN, P.; REES, J.F. Pyruvate prevents peroxide-induced injury of *in vitro* preimplantation bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 52, p. 149-157, 1999.

MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, v. 3, n.5, p. 403-439, 1997.

NASR-ESFAHANI, M.H.; AITKEN, J.R.; JOHNSON, M.H. Hydrogen peroxide levels in mouse oocyte and early cleavage stages embryos developed *in vitro* or *in vivo*. **Development**, v.109, p.501-07, 1990.

O'DONNELL-TORMEY, J.; NATHAN, C.F.; LANKS, K. Secretion of pyruvate: an antioxidant defense of mammalian cell. **Journal of Experimental Medicine**, v.65, p. 500-514, 1987.

O'FALLON, J.V.; WRIGTH, R.W. Jr. Pyruvate revisited: a non-metabolic role for pyruvate in preimplantation embryo. **Theriogenology**, v.43, p. 288, 1995.

OGASAWARA, M.; NAKAMURA, T., KOYAMA, I. Reactivity of taurine with aldehydes and its physiological role. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.41, p. 2172-175, 1993.

ÕURA, C.; TOSHIMORI, K. Ultrastructural studies on the fertilization of mammalian gametes. **International Review of Cytology**, v. 122, p. 105-151, 1990.

ORSI, N.N.; LEESE, H.J. Protection against reactive oxygen species during mouse preimplantation embryo development: Role of EDTA, oxygen tension, catalase, superoxide desmutase, and pyruvate. **Molecular Reproduction and Development**, v.49, p.44-53, 2001.

PEIXER, M.A.S.; DODE, M.A.N.; RUMPF, R. Produção *in vitro* de Embriões – Visão da Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, v.28, n. 1, p. 175-178, 2000.

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

PETERSON, R.N.; SILVERSTEIN, K.; FREUND, M. A rapid fluorometric method for the determination of DNA in human semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 41, p. 485-488, 1974.

RAMALHO, M.F.P. Estimativa da fertilidade de touros pela indução de reação acrossomal. In: SEMANA DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROPECUÁRIA – SECITAP, 14., 1999, Jaboticabal-SP. **Anais...** Jaboticabal, SP, p.169-170, 1999.

REERS, M.; SMITH, T.W.; CHEN, L.B. J-aggregate formation of a corbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potencial. **Biochemistry**, v.30, p. 4480-4486, 1991.

ROUX, C.; TRIPOGNEY, C.; JOANNE, C.; BRESSON, J.L. Qualité nucléaire du spermatozoïdes humains (protéines nucléaires). **Gynécologie Obstétrique e Fertilité**, v. 32, p. 792-798, 2004.

SUAREZ, S.S.; BROCKMAN, K.; LEFEBVRE, R. Distribution of mucus and sperm in bovine oviducts after artificial insemination: the physical environment of the oviductal sperm reservoir. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 447-453, 1997.

SUKARDI, S.; CURRY, M.R.; WATSON, P.F. Simultaneous detection of the acrosomal status and viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. **Reproduction Science**, v. 46, p. 89-96, 1997.

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

TEJADA, R.I.; MITCHELL, J.C.; NORMAN, A.; MARIK, J.J.; FRIEDMAN, S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. **Fertility and Sterility**, v.42, n.1, p.87-91, 1984.

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

THIBAUT, C. Are follicular maturation and oocyte maturation independent processes? **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 51, p. 1-15, 1977.

THOMAS, C.A.; GARNER, D.L.; DEJARNETTE, J.M.; MARSHALL, C.E. Effect of cryopreservation on bovine organelle function and viability as determined by flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 786-793, 1998.

UNANIAN, M.M. **Integridade da cromatina: método complementar para avaliação da qualidade do sêmen bovino**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000 21p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 56).

VAN DER HURK, R.; ZHAO, J. Regulação do crescimento oocitário e maturação em mamíferos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 17., 2003, Beberibe, CE. **Anais...** Beberibe, CE: Acta Scientiae Veterinariae, v. 31, suplemento, p. 172-205, 2003.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. (EDS) **The physiology of reproduction**, 2nd. ed., New York, Raven, 1994, p. 189-317.

ZENNER, A.; MÜLLER, K.; REGUSZYNSKI, K.; JEWGENOW, K. Apoptosis within bovine follicular cells and its effects on oocyte development during *in vitro* maturation. **Theriogenology**, v. 59, p. 1421-1433, 2003.

ZHENG, S.; NEWTON, G.L., GONICK, G. et al. Radioprotection of DNA by thiols: relationship between the net charge on a thiol and its ability to protect DNA. **Radiation Research**, v. 114, p. 11-20, 1988.

WAY, A.L.; HENAULT, M.A.; KILLIAN, G.J. Comparison of four staining methods for evaluation acrosome status and viability of ejaculate and caudal epididymal bull spermatozoa. **Theriogenology**, v. 43, p. 1301-1316, 1995.

CAPÍTULO 2 – EFEITO DE ANTIOXIDANTES ADICIONADOS AO MEIO DE FECUNDAÇÃO *IN VITRO* SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO BOVINO

RESUMO – No processo normal de metabolismo do embrião ocorre a formação de espécies reativas ao oxigênio (ROS). Danos oxidativos podem resultar uma baixa produção e /ou decréscimo de mecanismos que combatem as ROS. *In vivo*, oócitos e embriões parecem estar protegidos contra o estresse oxidativo pela ação de substâncias presentes no fluido folicular e fluidos do oviduto que eliminam ou amenizam o efeito das ROS. O objetivo desse experimento foi avaliar o efeito dos antioxidantes (cisteamina e 2-mercaptoetanol) e a presença ou ausência de heparina no meio de fecundação sobre a taxa de clivagem e desenvolvimento embrionário. Oócitos foram maturados *in vitro* (MIV) por 24h a 38,5°C e 5% de CO₂ em meio TCM-199 suplementado com 10% SFB). O meio de fecundação foi o TALP suplementado ou não com 10 µg de heparina e 160 µL da solução de PHE (denominados respectivamente de TALP-FIV/Hep+PHE ou TALP-FIV) que, dependendo do grupo experimental, foram suplementados com 50 µM de 2-Mercaptoetanol (2-ME), ou 50 µM de Cisteamina (Cist) ou 5 mM de *DL-Buthionine-Sulfoximine* (BSO) ou não receberam suplementação (CONTROLE). Os zigotos foram cultivados em meio SOFaa + 0,5%BSA +2,5%SFB. Foi analisada a taxa de clivagem, blastocistos (168 e 192 hpi) e eclosão (192hpi) (Exp.I), além da determinação da qualidade proporcional do número de células da massa celular interna (MCI) e do trofotoderma (TF) pela coloração diferencial por fluorocromo (Hoechst 33342) (Exp.II). No Exp I, as taxas médias de clivagem tanto entre os grupos (Contr, Cist, 2-ME e BSO) como entre os meios TALP-FIV na presença ou ausência de heparina não apresentaram diferença significativa ($P>0,05$). A adição de cisteamina no meio de fecundação influenciou negativamente ($P<0,05$) o desenvolvimento embrionário nas fases de blastocistos (BI) 168 e 192 hpi tanto entre os

grupos como nos meios TALP-FIV (com/sem heparina). A cisteamina mostrou uma taxa de eclosão (192 hpi) menor ($P < 0,05$) que o 2-ME. E quando o meio FIV foi suplementado com 2-ME na presença de heparina, esta demonstrou um efeito benéfico ($P < 0,05$) sobre a taxa de eclosão (BI 192hpi). No Exp II, não houve diferença estatística ($P > 0,05$) sobre o número de células da MCI e do TF entre os grupos e também entre os meios TALP-FIV (com/sem heparina). Nos dois experimentos a presença dos antioxidantes cisteamina e do 2-ME não influenciaram as taxas de clivagem, como também a qualidade proporcional do número de células da MCI e do TF. Porém, a cisteamina promoveu uma queda nas taxas de blastocistos (168 e 192 hpi) e de eclosão (192 hpi). Já a presença de heparina promoveu um aumento na produção de blastocistos e um efeito benéfico sobre a eclosão, quando meio TALP-FIV foi suplementado com antioxidante 2-ME.

Palavras-chave: Antioxidantes, desenvolvimento embrionário, FIV, heparina.

1 INTRODUÇÃO

A geração de espécies reativas ao oxigênio (ROS) é um processo natural que ocorre no metabolismo normal do embrião. A alta reatividade de algumas ROS (OH^-) requer primeiro a ativação de mecanismos de defesa que ocorrem logo após a geração da ROS e, segundo, a ativação de sistemas de defesa presentes nos sítios de geração da ROS (GUÉRIN, 2001).

Vários mecanismos de defesa estão presentes tanto nos embriões quanto a sua volta. *In vivo*, oócitos e embriões parecem estar protegidos contra o estresse oxidativo pela ação de substâncias presentes no fluido folicular e fluidos do oviduto que eliminam ou amenizam o efeito das ROS (GUÉRIN et al., 2001).

Danos oxidativos podem resultar uma baixa produção e /ou decréscimo de mecanismos que combatem as ROS. Algumas estratégias evitam o estresse oxidativo e previnem contra a formação das ROS, a interceptação (por antioxidantes) e o reparo (GUÉRIN et al., 2001).

Proteger embriões contra o estresse oxidativo parece ser uma das chaves em melhorar o desenvolvimento. Tem sido demonstrado que o desenvolvimento de embriões bovinos é promovido pelo uso do 2-mercaptoetanol, um composto thiol de baixo peso molecular usado como um agente redutor em meios de cultivo (TAKAHASHI et al., 1993). O efeito do 2-mercaptoetanol na maturação oocitária e no desenvolvimento embrionário está correlacionado com a biosíntese intracelular de glutathiona (GSH) (DE MATOS et al., 1996; DE MATOS; FURNUS, 2000; TAKAHASHI et al., 1993). Devido ao importante papel do GSH na proteção contra os danos oxidativos (DE MATOS; FURNUS, 2000), os níveis de GSH encontrados no oócito no final da maturação são considerados bons marcadores bioquímicos da viabilidade oocitária (ABEYDEERA et al., 1998).

O uso da cisteamina (Cist), também um composto *thiol* de baixo peso molecular, protege as células contra a radiação ionizante e age sobre o radical hidroxila (OH⁻). Porém, cisteamina na concentração de 250 µmol/L apresentou um efeito negativo sobre a taxa de blastocistos (GUÉRIN et al., 2001). Este dado sugeriu que um excesso ou redução na concentração dos compostos *thiol* pode ser deletério e que o equilíbrio redox é importante para a maturação do oócito e desenvolvimento embrionário (GUÉRIN et al., 2001). A alteração no “status” *thiol*-redox nos embriões pode resultar no bloqueio do ciclo celular, apoptose, e/ou morte celular (LIU et al., 1999).

A suplementação de glutathione (GSH) tem sido recomendada para superar o bloqueio de 2 células e melhorar o desenvolvimento do estágio de 1 célula de embriões de camundongos (NASR-ESFAHANI et al., 1992) e também aumentar a produção *in vitro* de embriões bovinos (LUVONI et al., 1996).

A hipotaurina, direta ou indiretamente (via conversão em taurina) possui um efeito benéfico e parece ser uma boa candidata para ser adicionada ao meio de cultura, tanto de oócito, quanto de embriões, sendo assim, freqüentemente adicionada ao meio e cultura de embriões bovinos (GUÉRIN et al., 2001).

A suplementação do meio de MIV com Cist, 2-ME, cisteína e cistina induz a síntese de GSH (DE MATOS; FURNUS, 2000). Além disso, o *buthionine sulphoximine* (BSO), um específico inibidor da síntese de GSH, pode neutralizar o efeito promovido pelos compostos *thiol* e o desenvolvimento e a síntese de GSH nos embriões bovinos (TAKAHASHI et al., 1993).

Estudos revelaram que as taxas de fecundação de grupos tratados com heparina foram altamente significativas em relação ao grupo controle e houve, também, um aumento na taxa de embriões produzidos quando a concentração de heparina foi igual ou superior a 18 µg/mL (GORDON, 1994). Há indicações de que a heparina não somente influencia o processo

de fertilização, mas também afeta o desenvolvimento embrionário subsequente (GORDON, 1994).

O objetivo desse experimento foi avaliar os efeitos dos antioxidantes (cisteamina e 2-mercaptoetanol), do inibidor BSO e a adição ou não de heparina no meio de fecundação sobre a taxa de clivagem, desenvolvimento e qualidade embrionária.

2 MATERIAL E MÉTODO

2.1 Obtenção e seleção dos oócitos

Os ovários bovinos coletados em abatedouro, situado na cidade de Birigui/SP e foram transportados ao laboratório em solução salina a 30-33°C e seus folículos antrais de 3 a 8 mm de diâmetro, foram aspirados com auxílio de agulha de 18-G acoplada à seringa de 20 mL. O fluido folicular aspirado foi transferido para tubo cônico de 50 mL e decantado por 15 minutos para a sedimentação dos oócitos. Posteriormente, o sedimento foi transferido para placa de poliestireno de 60 mm de diâmetro e avaliado em microscópio estereoscópico. Foram selecionados complexos-*cumulus*-oócito (COCs) com coloração uniforme do ooplasma e que possuíam *cumulus* compacto com pelo menos 4 camadas de células.

2.2 Maturação *in vitro*

Os COCs selecionados foram lavados duas vezes em meio de lavagem H-199 (constituído por meio TCM-199, suplementado com 0,2 mM de Piruvato, 20 mM de HEPES, 5 mM de Bicarbonato de sódio, 75 µg de Sulfato de amicacina/mL) e uma vez em meio de maturação B-199 (constituído por meio TCM-199 suplementado com 0,2 mM de Piruvato, 25 mM de Bicarbonato de Sódio, 75 µg de Sulfato de amicacina/mL, 1 µg de 17-β Estradiol/mL, 500 UI de FSH/mL, 100 UI de hCG/mL) acrescentava-se 10% de SFB. Foram transferidas 20 estruturas/microgota de 100 µl. Os oócitos foram maturados durante 24 horas em estufa a 38,5°C, 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

2.3 Fecundação *in vitro*

A fecundação foi realizada 24 horas após o início do cultivo de maturação. Três palhetas de sêmen de um único touro e da mesma partida foram descongeladas à temperatura de 35-37°C por 30 segundos, e lavadas por três vezes em 2mL de meio TL-Sêmen (WOLF, 2005) cada vez,

adicionado de antibiótico (2 μ L/mL de Sulfato de amicacina-250mg) e 2 μ L/mL de Piruvato sódico (100mM), por centrifugação a 750 rpm durante 5 minutos.

O sedimento recuperado foi avaliado quanto ao volume, concentração e motilidade espermática. A concentração final foi ajustada para 25x10⁶ espermatozóides por mL de meio de fecundação TALP-FIV (BAVISTER, 1989).

De acordo com o grupo experimental, o meio TALP-FIV foi (TALP-FIV/Hep+PHE) ou não (TALP-FIV) suplementado com 10 μ g de heparina e 160 μ L da solução de PHE, segundo Bavister, (1989). Ainda dependendo do grupo experimental, o TALP-FIV ou TALP-FIV/Hep+PHE utilizado foi o padrão do laboratório (CONTROLE) ou foi suplementado com 50 μ M de 2-Mercaptoetanol (2-ME), ou 50 μ M de Cisteamina (Cist) ou 5 mM de DL-Buthionine-Sulfoximine (BSO). Aproximadamente 100x10³ espermatozóides foram adicionados a cada “poço” de 1,5 mL de meio TALP-FIV, correspondendo a 4 x10³ espermatozóides por oócito, designado a cada grupo experimental. Os oócitos foram lavados duas vezes em meio H-199, suplementado com 0,5% de BSA livre de ácidos graxos, e uma vez em meio TALP-FIV. Foram adicionados 20 oócitos por “poço” de FIV, que foram co-incubados com os espermatozóides a 38,5C°, por 18 a 20 horas em atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

2.4 Cultivo Embrionário *In Vitro*

Após fecundação, os zigotos foram lavados por três vezes (sem a remoção total das células do *cumulus*) e co-cultivados em gotas de 100 μ L de meio SOF aa suplementado com 0,5% de BSA e 2,5% de SFB à temperatura de 38,5°C em atmosfera de 5% CO₂ em ar, por 10 dias. A cada 48 horas, 50% do meio de cultivo foi renovado. A clivagem foi avaliada 48 horas após a inseminação (hpi), o desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto foi avaliado 168 e 192 hpi e a eclosão dos blastocistos foi avaliada 192 hpi (Experimento 1). O experimento 2 seguiu o mesmo

protocolo de cultivo descrito acima, porém os embriões foram cultivados durante sete dias após a FIV até o estágio de blastocisto. Então foram submetidos à técnica de coloração diferencial por fluorocromo (IWASAKI et al., 1990) para avaliação da qualidade morfológica dos blastocistos produzidos pela proporção da massa celular interna (MCI) e do trofotoderma (TF).

2.5 Determinação da Massa Celular Interna (MCI) e Trofotoderma (TF)

A coloração foi baseada na técnica de coloração diferencial por fluorocromo, descrita por Iwasaki et al. (1990). Os blastocistos obtidos sete dias após a fecundação foram tratados com Pronase (0,5% em PBS) a 37°C por 5 minutos, para a remoção da zona pelúcida. Os embriões foram lavados três vezes em meio TCM-199 Hepes com 10% de SFB e duas em meio TCM-199 Hepes sem SFB. Os blastocistos foram incubados em gelo durante 10 minutos, em solução de ácido pícrico (10mM) e polivinilpirrolidona (PVP) (3mg/mL) em PBS. A seguir, foram lavados em meio TCM-199 Hepes, incubados a 38,5°C por 20 minutos em soro de coelho anti-bovino na proporção de 1:10 em meio TCM-199 Bicarbonato. Os embriões foram lavados em meio TCM-199 com 10% de SFB, incubados a 38,5°C por 30 minutos em complemento de cobaia na proporção de 1:10 em meio TCM-199 Hepes acrescido de 10µg/mL de iodeto de propídio (PI) e 10µg/mL de Hoechst 33342. Por fim, estes foram lavados em PBS com 0,3% de BSA e fixados em lâminas com glicerol. Os blastocistos foram avaliados quanto ao número de células da MCI e TF em microscópio de epifluorescência (Olympus IX - Japão), com filtro de 460-570 nm e emissão de 460-610 nm. Os núcleos com fluorescência azul foram considerados como células da MCI determinada pelo Hoechst 33342 (corante vital) e fluorescência rosa pelo PI, como células do TF (corante não vital).

2.6 Delineamento Experimental

Foram realizados dois experimentos com no mínimo 5 repetições cada. Os reagentes e meios foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO). As estufas foram calibradas para a temperatura de 38,5 °C com 5% CO₂ em ar e umidade máxima durante todo o experimento. Os grupos experimentais estão esquematizados na Tabela 1 e descritos abaixo.

Tabela 1- Preparação dos meios de maturação, fecundação e cultivo *in vitro*.

Meio MIV	Meio FIV		Meio CIV	
TCM 199 + 0,2 mM piruvato, 25 mM bicarbonato de sódio, 75 µg amicacina/ml, + 17 β estradiol/ml, 500 UI FSH/mL, 100 UI de hCG/mL 10% de SFB	TALP-FIV +Heparina (10 µg) / PHE (160 µL)	C	0,6% de BSA	SOF aa + 0,5% de BSA 2,5 % de SFB
		CIS	0,6% de BSA + 50 µM de Cisteamina	
		2-ME	0,6% de BSA + 50 µM de 2-Mercaptoetanol	
		BSO	0,6% de BSA + 5 mM DL-Buthionine	
	TALP-FIV	C	0,6% de BSA	
		CIS	0,6% de BSA + 50 µM de Cisteamina	
		2-ME	0,6% de BSA + 50 µM de 2-Mercaptoetanol	
		BSO	0,6% de BSA + 5 mM DL-Buthionine	

2.6.1 Experimento 1 – Avaliação das taxas de clivagem e do desenvolvimento embrionário

Os procedimentos experimentais foram citados anteriormente e estão sumarizados na Figura 1 como descrito abaixo. Foram utilizados 741 oócitos num total de 5 repetições realizadas em dias diferentes.

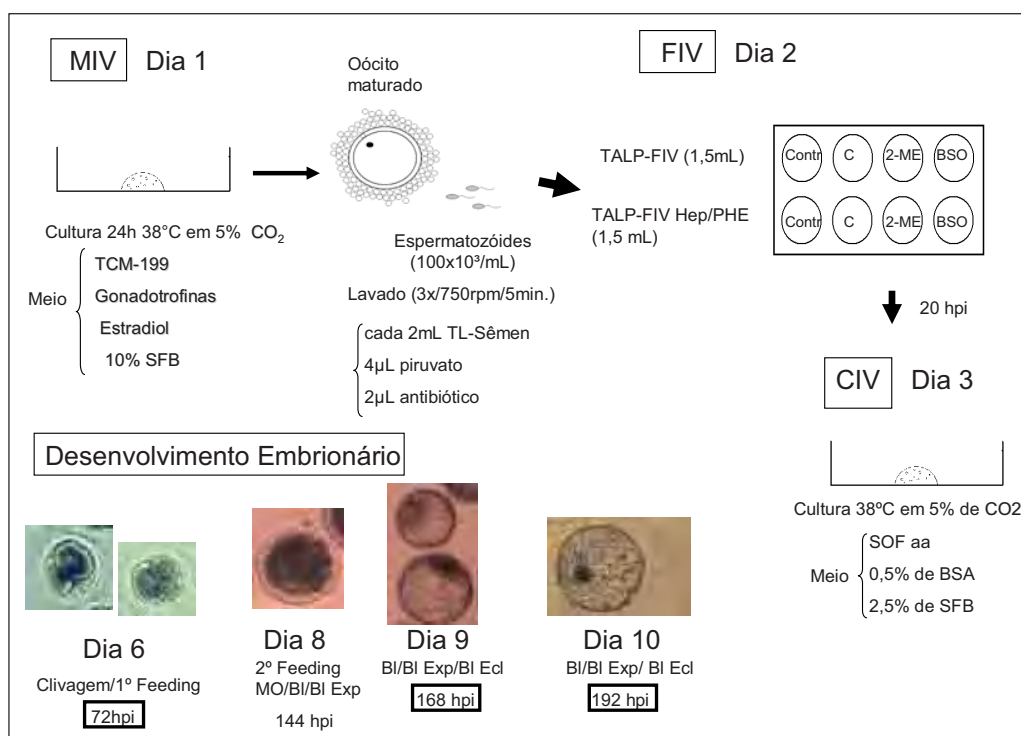


Figura 1- Esquema da fecundação *in vitro* e avaliação da clivagem e desenvolvimento embrionário.

2.6.2 Experimento 2 – Determinação da qualidade proporcional do número da MCI e TF nos embriões CIV

Os procedimentos experimentais foram citados anteriormente e estão esquematizados na Figura 2. Neste experimento foram utilizados 191 embriões e realizadas 7 repetições.

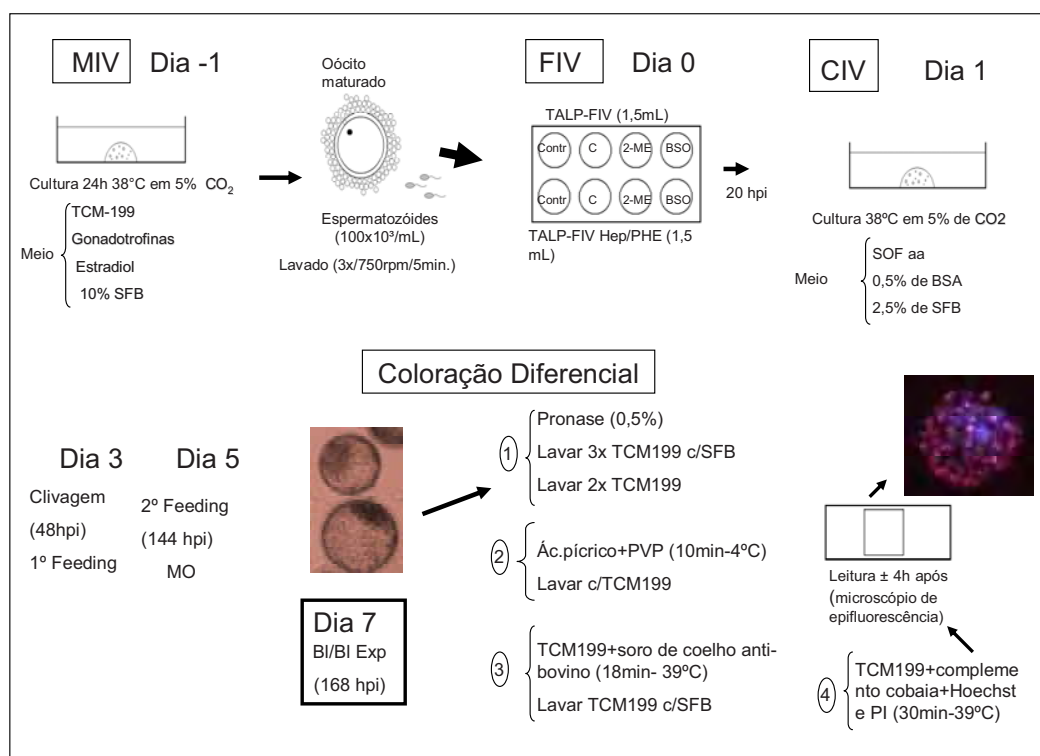


Figura 2- Esquema da fecundação *in vitro* e coloração diferencial dos embriões por fluorocromo (Hoechst 33342).

2.7 Análise Estatística

Para avaliar o efeito da suplementação do meio de FIV sobre a fecundação, desenvolvimento e qualidade morfológica do embrião, os dados foram analisados pela fração de oócitos inseminados atingindo os estádios determinados de desenvolvimento embrionário, reportados em termos de porcentagem (%). Como a porcentagem de oócitos clivados blastocistos e do número da MCI e do TF não obteve distribuição normal, os dados foram transformados em $\arcsin \sqrt{\%}$. Foi aplicada Análise de Variância (ANOVA) considerando-se um experimento fatorial para verificação de diferenças entre tratamentos (suplemento do meio de fecundação), presença ou ausência de heparina e suas interações. Posteriormente, foi aplicado teste de Tukey para comparação múltipla das médias.

Para comparação entre as médias e as frequências de blastocistos superiores, excelentes, número total de células (T) e proporção entre MCI:TF \geq 1:2 pelo teste do Qui-Quadrado (χ^2). O nível de significância adotado foi de 5%. A análise estatística foi efetuada empregando-se o programa "Statistical Analysis System" (Sas Institute Inc, 1989), SAS\STAT Software, Release 8.2. Cary: SAS Institute Inc. (LITTLELL et al., 1996).

3 RESULTADO

3.1 Experimento 1 - Avaliação das taxas de clivagem e do desenvolvimento embrionário

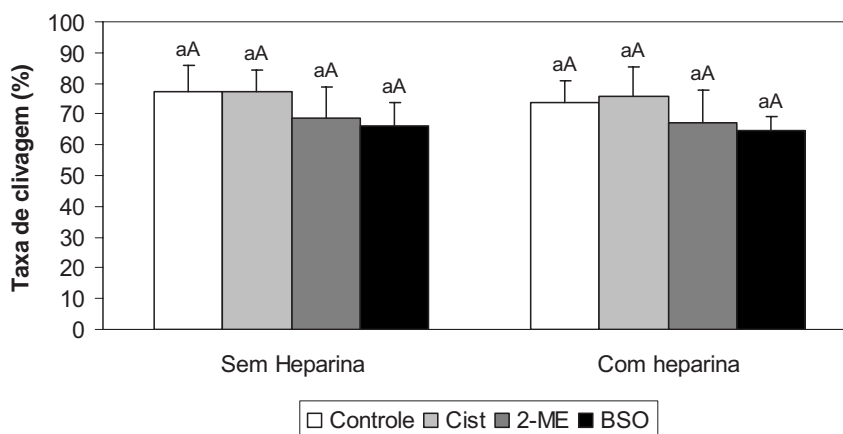
As taxas de clivagem dos embriões fecundados em meio suplementado com antioxidantes (grupos: Contr, Cist, 2-ME e BSO), com ou sem adição de heparina (respectivamente, meios: TALP-FIV/Hep+PHE e TALP-FIV) estão representadas na Tabela 2 e na Figura 3. Não foi observada diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$) e também entre os meios TALP-FIV sem heparina ($72,5 \pm 4,0$) e TALP-FIV com heparina ($70,4 \pm 3,8$) sobre a porcentagem de clivagem.

As taxas de blastocistos produzidos 168 hpi entre os grupos (Contr, Cist, 2-ME e BSO) nos meios TALP-FIV sem adição de heparina e no meio TALP-FIV com adição de heparina são apresentadas na Tabela 3 e Figura 4. A adição do antioxidante cisteamina no meio de fecundação influenciou negativamente ($P < 0,05$) o desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto 168 hpi quando em comparação com os demais grupos, e isto foi observado nos dois meios TALP-FIV (sem/com heparina) utilizados. Ainda, foi observado aumento significativo ($P < 0,05$) na produção de blastocistos 168 hpi após fecundação em meio contendo heparina ($16,7 \pm 6,5$) em relação ao meio TALP-FIV sem adição de heparina ($1,2 \pm 1,2$).

Tabela 2- Porcentagem média de clivagem de oócitos fecundados *in vitro* em meio FIV contendo ou não antioxidantes, com sêmen capacitado ou não com heparina

Grupo	Nº de Oócitos	Taxa de Clivagem (% Média \pm EPM)		
		Sem heparina	Com heparina	Média
Controle	187	77,5 \pm 8,6 ^{aA}	73,8 \pm 6,8 ^{aA}	75,7 \pm 5,2 ^a
Cist.	187	77,4 \pm 6,7 ^{aA}	75,8 \pm 9,4 ^{aA}	76,6 \pm 5,4 ^a
2-ME	183	68,8 \pm 9,9 ^{aA}	67,1 \pm 10,4 ^{aA}	68,0 \pm 6,8 ^a
BSO	184	66,1 \pm 7,6 ^{aA}	64,8 \pm 4,2 ^{aA}	65,5 \pm 4,1 ^a
Média	741	72,5 \pm 4,0 ^A	70,4 \pm 3,8 ^A	

Cist = Cisteamina; 2-ME = 2-Mercaptoetanol; BSO = *DL-Buthionine Sulfoximide*. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna (^{ab}), e maiúsculas diferentes na linha (^{AB}) diferem entre si (P<0,05).



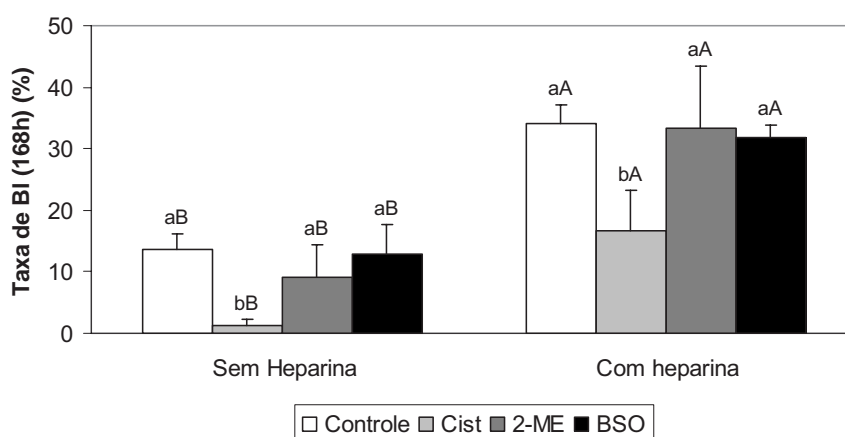
Cist = Cisteamina; 2-ME = 2-Mercaptoetanol; BSO = *DL-Buthionine Sulfoximide*. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes (^a), entre grupos (Controle vs Cist vs 2-ME vs BSO), diferem entre si (P<0,05). Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes (^A), entre presença ou ausência de heparina (Grupo Com Heparina vs Grupo Sem Heparina) diferem entre si (P<0,05).

Figura 3- Porcentagem média de clivagem de oócitos fecundados *in vitro* em meio FIV contendo antioxidantes (Cisteamina ou 2-Mercaptoetanol) ou inibidor da síntese de GSH (*DL-Buthionine Sulfoximide*-BSO), com sêmen capacitado ou não com heparina.

Tabela 3- Porcentagem média de blastocistos produzidos 168 horas após a fecundação *in vitro* de oócitos em meio FIV contendo ou não antioxidantes, com sêmen capacitado ou não com heparina.

Grupo	Nº de Oócitos	Taxa de BI (168hpi) (% Média ± EPM)		
		Sem heparina	Com heparina	Média
Controle	187	13,5 ± 2,6 ^{aB}	34,2 ± 3,0 ^{aA}	23,8 ± 3,9 ^a
Cist.	185	1,2 ± 1,2 ^{bB}	16,7 ± 6,5 ^{bA}	8,9 ± 4,0 ^b
2-ME	183	9,1 ± 5,2 ^{aB}	33,3 ± 10,0 ^{aA}	21,2 ± 6,7 ^a
BSO	184	13,0 ± 2,0 ^{aB}	31,9 ± 4,8 ^{aA}	22,4 ± 4,0 ^a
Média	739	9,2 ± 1,8 ^B	29,0 ± 3,5 ^A	

Cist = Cisteamina; 2-ME = 2-Mercaptoetanol; BSO = *DL-Buthionine Sulfoximide*. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna (^{ab}), e maiúsculas diferentes na linha (^{AB}) diferem entre si (P<0,05).



Cist = Cisteamina; 2-ME = 2-Mercaptoetanol; BSO = *DL-Buthionine Sulfoximide*. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes (^{ab}), entre grupos (Controle vs Cist vs 2-ME vs BSO), diferem entre si (P<0,05). Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes (^{AB}), entre presença ou ausência de heparina (Grupo Com Heparina vs Grupo Sem Heparina) diferem entre si (P<0,05).

Figura 4- Porcentagem média de blastocistos produzidos 168 horas após a fecundação *in vitro* de oócitos em meio FIV contendo antioxidantes (Cisteamina ou 2-Mercaptoetanol) ou inibidor da síntese de GSH (*DL-Buthionine Sulfoximide*-BSO), com sêmen capacitado ou não com heparina.

As taxas de blastocistos produzidos 192 hpi entre os grupos (Contr, Cist, 2-ME e BSO) nos meios TALP-FIV sem adição de heparina e no meio TALP-FIV com adição de heparina estão expostas na Tabela 4 e Figura 5. A adição do antioxidante cisteamina no meio de fecundação influenciou negativamente ($P < 0,05$) o desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto 192 hpi quando em comparação com os demais grupos, e isto foi observado nos dois meios TALP-FIV (sem/com heparina) utilizados. Ainda, foi observado aumento significativo ($P < 0,05$) na produção de blastocistos 192 hpi após fecundação em meio contendo heparina em relação ao meio TALP-FIV sem adição de heparina.

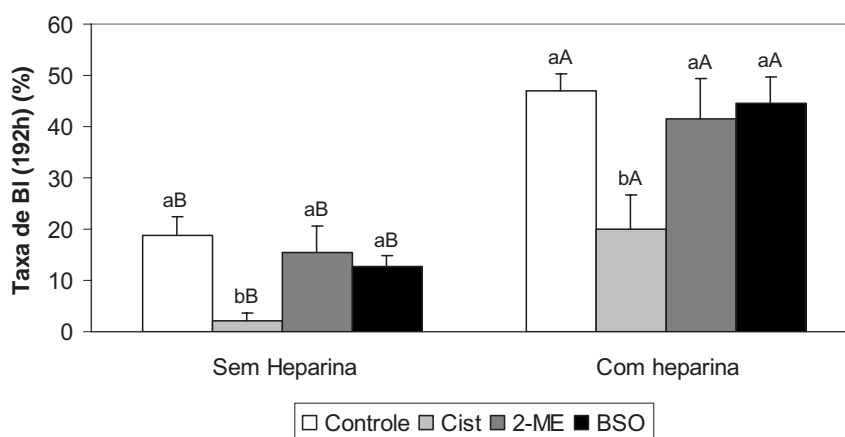
As taxas de eclosão de blastocistos 192 hpi entre os grupos (Contr, Cist, 2-ME e BSO) nos meios TALP-FIV sem adição de heparina e no meio TALP-FIV com adição de heparina estão expostas na Tabela 5 e Figura 6. Quando a fecundação foi realizada em meio contendo heparina, os grupos Cist, 2-ME e BSO apresentaram taxas de eclosão similares aos do grupo controle ($P > 0,05$), no entanto, o antioxidante cisteamina (Cist) mostrou uma taxa significativamente menor que o antioxidante 2-ME ($P < 0,05$). Quando a fecundação foi realizada em meio sem heparina, os grupos 2-ME e BSO apresentaram taxas de eclosão similares aos do grupo controle ($P > 0,05$), enquanto que o antioxidante cisteamina (Cist) mostrou uma taxa significativamente menor que os demais ($P < 0,05$).

A comparação entre os grupos fecundados na presença ou ausência de heparina demonstrou efeito benéfico da heparina na eclosão de blastocistos 192 hpi ($P < 0,05$) somente quando o meio de FIV foi suplementado com 2-ME, mas não demonstrou efeito quando os meios foram suplementados com Cist ou BSO, ou mesmo no grupo Controle ($P > 0,05$).

Tabela 4- Porcentagem média de blastocistos produzidos 192 horas após a fecundação *in vitro* de oócitos em meio FIV contendo ou não antioxidantes, com sêmen capacitado ou não com heparina.

Grupo	Nº de Oócitos	Taxa de BI (192hpi) (% Média ± EPM)		
		Sem heparina	Com heparina	Média
Controle	182	18,8 ± 3,6 ^{aB}	47,1 ± 3,2 ^{aA}	32,9 ± 5,2 ^a
Cist.	187	2,2 ± 1,4 ^{bB}	19,9 ± 6,7 ^{bA}	11,0 ± 4,4 ^b
2-ME	183	15,6 ± 5,1 ^{aB}	41,5 ± 7,8 ^{aA}	28,5 ± 6,2 ^a
BSO	184	12,6 ± 2,3 ^{aB}	44,6 ± 5,2 ^{aA}	28,6 ± 6,0 ^a
Média	736	12,3 ± 2,1 ^B	38,2 ± 3,7 ^A	

Cist = Cisteamina; 2-ME = 2-Mercaptoetanol; BSO = *DL-Buthionine Sulfoximide*. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna (^{ab}), e maiúsculas diferentes na linha (^{AB}) diferem entre si (P<0,05).



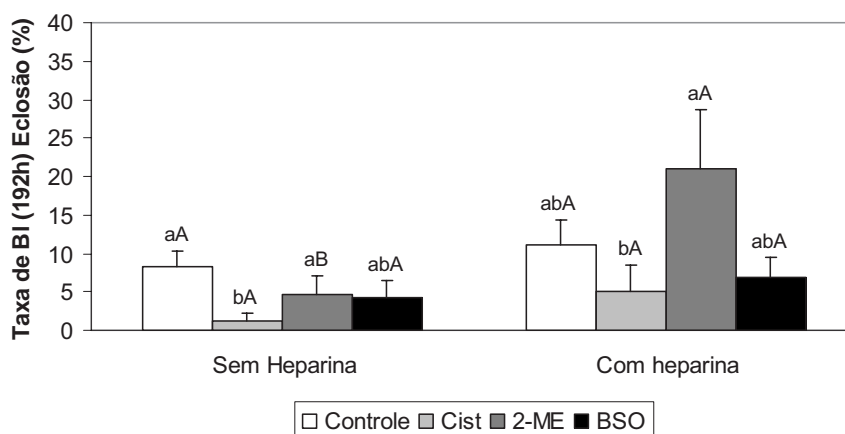
Cist = Cisteamina; 2-ME = 2-Mercaptoetanol; BSO = *DL-Buthionine Sulfoximide*. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes (^{ab}), entre grupos (Controle vs Cist vs 2-ME vs BSO), diferem entre si (P<0,05). Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes (^{AB}), entre presença ou ausência de heparina (Grupo Com Heparina vs Grupo Sem Heparina) diferem entre si (P<0,05).

Figura 5- Porcentagem média de blastocistos produzidos 192 horas após a fecundação *in vitro* de oócitos em meio FIV contendo antioxidantes (Cisteamina ou 2-Mercaptoetanol) ou inibidor da síntese de GSH (*DL-Buthionine Sulfoximide*-BSO), com sêmen capacitado ou não com heparina.

Tabela 5- Porcentagem média de blastocistos eclodidos 192 horas após a fecundação *in vitro* de oócitos em meio FIV contendo ou não antioxidantes, com sêmen capacitado ou não com heparina.

Grupo	Nº de Oócitos	Blastocistos Eclodidos (192hpi) (% Média ± EPM)		
		Sem heparina	Com heparina	Média
Controle	190	8,3 ± 2,0 ^{aA}	11,2 ± 3,1 ^{abA}	9,7 ± 1,8 ^{ab}
Cist.	185	1,2 ± 1,2 ^{bA}	5,1 ± 3,3 ^{bA}	3,2 ± 1,8 ^b
2-ME	188	4,7 ± 2,3 ^{aB}	21,1 ± 7,7 ^{aA}	12,9 ± 4,7 ^a
BSO	168	4,2 ± 2,1 ^{abA}	6,9 ± 2,5 ^{abA}	5,4 ± 1,6 ^{ab}
Média	731	4,6 ± 1,1 ^B	11,3 ± 2,6 ^A	

Cist = Cisteamina; 2-ME = 2-Mercaptoetanol; BSO = *DL-Buthionine Sulfoximide*. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna (^{ab}), e maiúsculas diferentes na linha (^{AB}) diferem entre si (P<0,05).



Cist = Cisteamina; 2-ME = 2-Mercaptoetanol; BSO = *DL-Buthionine Sulfoximide*. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes (^{ab}), entre grupos (Controle vs Cist vs 2-ME vs BSO), diferem entre si (P<0,05). Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes (^A), entre presença ou ausência de heparina (Grupo Com Heparina vs Grupo Sem Heparina) diferem entre si (P<0,05).

Figura 6- Porcentagem média de blastocistos eclodidos 192 horas após a fecundação *in vitro* de oócitos em meio FIV contendo antioxidantes (Cisteamina ou 2-Mercaptoetanol) ou inibidor da síntese de GSH (*DL-Buthionine Sulfoximide*-BSO), com sêmen capacitado ou não com heparina.

3.2 Experimento 2 – Determinação da qualidade proporcional do número da MCI e TF nos embriões CIV

Após a avaliação da produção de blastocistos, no sétimo dia de CIV, aproximadamente, a metade dos embriões produzidos em cada grupo foram submetidos à verificação da qualidade proporcional do número de células da MCI e do TF. Dos 191 embriões destinados à coloração diferencial, por fluorocromo (Hoechst 33342), em microscopia de epifluorescência (Figura 7) 93 foram analisados para determinar o número médio de células que constituem a MCI e o TF, considerando uma perda de 51,3% durante o processo de coloração. Assim como a classificação dos blastocistos quanto à qualidade baseada na média, em superior ou inferior.

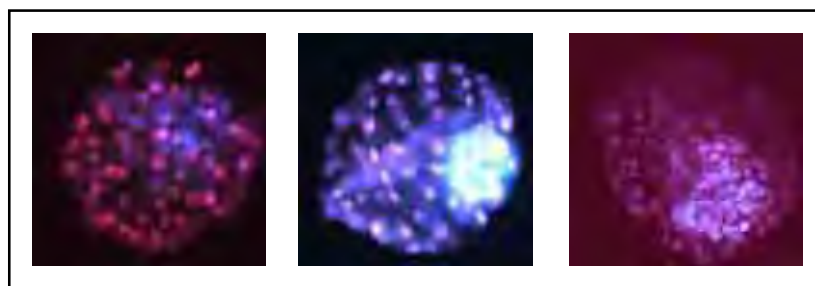


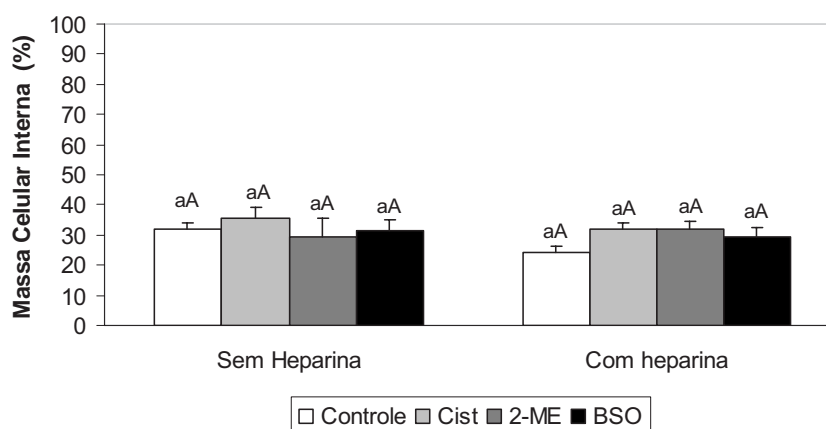
Figura 7- Blastocisto (sete dias após a FIV) analisados pela técnica de coloração diferencial, sob microscopia de epifluorescência. Azul (Hoechst 33342): núcleos de células da massa celular interna (MCI); Vermelho (iodeto de propídio-PI) núcleo de células do trofotoderma (TF). Imagens digitalizadas.

As porcentagens médias da massa celular interna (MCI) e de blastocisto (sete dias após a FIV) entre os grupos (Contr, Cist, 2-ME e BSO) nos meios TALP-FIV sem adição de heparina e no meio TALP-FIV com adição de heparina estão expostas na Tabela 6 e Figura 8. Não foi observada diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$) e também entre os meios TALP-FIV sem heparina ($32,42 \pm 1,74$) e TALP-FIV com heparina ($28,91 \pm 1,26$) sobre a porcentagem média de células na MCI.

Tabela 6- Porcentagem média da massa celular interna (MCI) em relação ao número de blastocistos produzidos sete dias após a fecundação *in vitro* em meio FIV contendo ou não antioxidantes, com sêmen capacitado ou não com heparina.

Grupo	Nº de Blastocistos	Massa Celular Interna (MCI) (% Média ± EPM)		
		Sem heparina	Com heparina	Média
Controle	29	31,71 ± 2,18	24,12 ± 2,05	27,06 ± 1,64 ^a
Cist.	24	35,50 ± 3,88	31,80 ± 2,28	33,34 ± 2,08 ^a
2-ME	17	29,33 ± 6,02	32,08 ± 2,39	31,60 ± 2,17 ^a
BSO	23	31,22 ± 3,65	29,43 ± 3,14	30,29 ± 2,34 ^a
Média	93	32,42 ± 1,74 ^A	28,91 ± 1,26 ^A	

Cist = Cisteamina; 2-ME = 2-Mercaptoetanol; BSO = *DL-Buthionine Sulfoximide*. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna (^a), e maiúsculas diferentes na linha (^A) diferem entre si (P<0,05).



Cist = Cisteamina; 2-ME = 2-Mercaptoetanol; BSO = *DL-Buthionine Sulfoximide*. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes (^a), entre grupos (Controle vs Cist vs 2-ME vs BSO), diferem entre si (P<0,05). Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes (^A), entre presença ou ausência de heparina (Grupo Com Heparina vs Grupo Sem Heparina) diferem entre si (P<0,05).

Figura 8- Porcentagem média da massa celular interna (MCI) em relação ao número de blastocistos produzidos sete dias após a fecundação *in vitro* em meio FIV contendo ou não antioxidantes, com sêmen capacitado ou não com heparina.

As porcentagens média do trofotoderma (TF) de blastocisto (sete dias após a FIV) entre os grupos (Contr, Cist, 2-ME e BSO) nos meios TALP-FIV sem adição de heparina e no meio TALP-FIV com adição de heparina estão expostas na Tabela 7 e Figura 9. Os dados não apresentaram diferença significativa entre os grupos ($P>0,05$) e também entre os meios TALP-FIV na ausência de heparina ($67,58 \pm 1,74$) e TALP-FIV na presença de heparina ($71,09 \pm 1,26$) sobre a porcentagem média de células do TF.

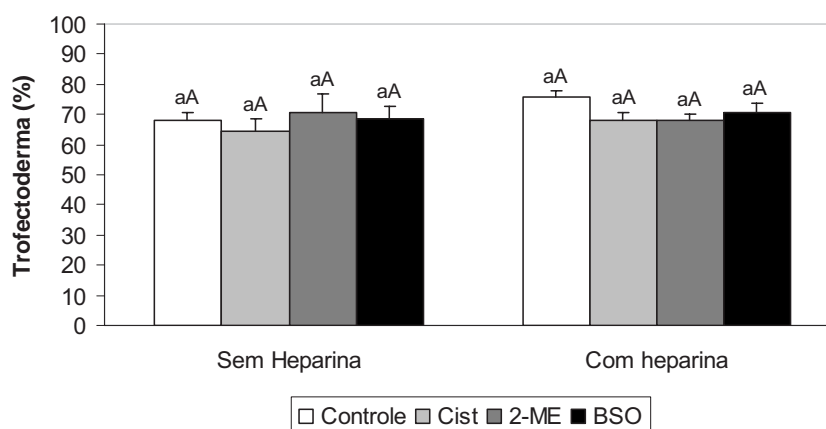
Para avaliar melhor os resultados do Exp. 2, os dados foram reavaliados segundo critérios inerentes à variável analisada, na verificação da qualidade proporcional MCI:TF. Baseado nas médias gerais aproximadas do número de células da MCI (20), do TF (46) e do T(66) e, na proporção de células MCI:TF \geq 1:2, os blastocistos foram classificados em embriões de qualidade superior (Tabela 8 e Figura 10). Estas médias utilizadas foram obtidas dos dados do trabalho, apenas para avaliar os resultados deste experimento.

De acordo com os dados obtidos, não houve diferenças significantivas ($P>0,05$) na frequência de embriões com maior MCI e TF, número total de células do embrião (T). Com relação a proporção MCI:TF \geq 1:2 observou um aumento significativo ($P<0,05$) na proporção de MCI:TF, entre o grupo cisteamina (TALP-FIV/sem heparina) em relação ao grupo controle (TALP-FIV/com heparina).

Tabela 7- Porcentagem média do trofotoderma (TF) em relação ao número de blastocistos produzidos sete dias após a fecundação *in vitro* em meio FIV contendo ou não antioxidantes, com sêmen capacitado ou não com heparina.

Grupo	Nº de Blastocistos	Trofotoderma (TF) (% Média \pm EPM)		
		Sem heparina	Com heparina	Média
Controle	29	68,29 \pm 2,18	75,88 \pm 2,05	72,94 \pm 1,64 ^a
Cist.	24	64,50 \pm 3,88	68,20 \pm 2,28	66,66 \pm 2,08 ^a
2-ME	17	70,66 \pm 6,02	67,92 \pm 2,39	68,40 \pm 2,17 ^a
BSO	23	68,78 \pm 3,65	70,57 \pm 3,14	69,71 \pm 2,34 ^a
Média	93	67,58 \pm 1,74 ^A	71,09 \pm 1,26 ^A	

Cist = Cisteamina; 2-ME = 2-Mercaptoetanol; BSO = DL-Buthionine Sulfoximide. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna (^a), e maiúsculas diferentes na linha (^A) diferem entre si (P<0,05).



Cist = Cisteamina; 2-ME = 2-Mercaptoetanol; BSO = DL-Buthionine Sulfoximide. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes (^a), entre grupos (Controle vs Cist vs 2-ME vs BSO), diferem entre si (P<0,05). Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes (^A), entre presença ou ausência de heparina (Grupo Com Heparina vs Grupo Sem Heparina) diferem entre si (P<0,05).

Figura 9- Porcentagem média do trofotoderma (TF) em relação ao número de blastocistos produzidos sete dias após a fecundação *in vitro* em meio FIV contendo ou não antioxidantes, com sêmen capacitado ou não com heparina.

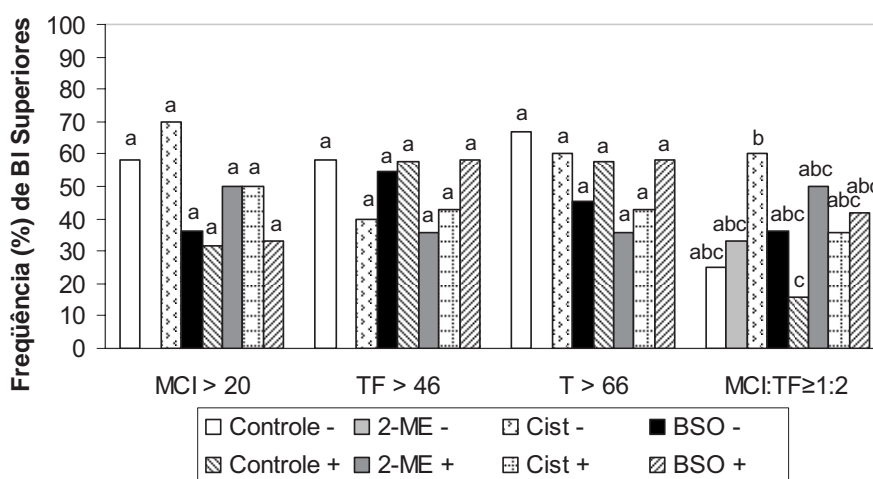
Tabela 8- Freqüência (%) média de blastocistos de qualidade superior (MCI >20; TF>46; T>75 e MCI:TF≥1:2) produzidos sete dias após a fecundação *in vitro* em meio FIV contendo ou não antioxidantes, com sêmen capacitado ou não com heparina.

GRUPO		Freqüência (%) média de blastocistos de qualidade superior			
		MCI > 20	TF > 46	T > 66	MCI:TF ≥ 1:2
SEM HEPARINA	Contr	58,3 (7/12) ^a	58,3 (7/12) ^a	66,7 (8/12) ^a	25,0(3/12) ^{abc}
	Cist.	70,0 (7/10) ^a	40,0 (4/10) ^a	60,0 (6/10) ^a	60,0 (6/10) ^b
	2-ME	0,0 (0/3) ^a	0,0 (0/3) ^a	0,0 (0/3) ^a	33,0 (1/3) ^{abc}
	BSO	36,4 (4/11) ^a	54,5 (6/11) ^a	45,5 (5/11) ^a	36,4(4/11) ^{abc}
COM HEPARINA	Contr	31,6 (6/19) ^a	57,9(11/19) ^a	57,9(11/19) ^a	15,8(3/19) ^c
	Cist.	50,0 (7/14) ^a	42,9 (6/14) ^a	42,9 (6/14) ^a	35,7(5/14) ^{abc}
	2-ME	50,0 (7/14) ^a	35,7 (5/14) ^a	35,7 (5/14) ^a	50,0(7/14) ^{abc}
	BSO	33,3 (4/12) ^a	58,3 (7/12) ^a	58,3 (7/12) ^a	41,7(5/12) ^{abc}

Cist = Cisteamina; 2-ME = 2-Mercaptoetanol; BSO = *DL-Buthionine Sulfoximide*.

MCI=Massa celular interna; TF=Trofectoderma; T=Total de células constituintes do embrião; MCI:TF=Proporção MCI:TF

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna (^a), e maiúsculas diferentes na linha (^A) diferem entre si (P<0,05).



Cist = Cisteamina; 2-ME = 2-Mercaptoetanol; BSO = *DL-Buthionine Sulfoximide*

(-) Sem Heparina; (+) Com Heparina

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes (^a), entre grupos (Controle vs Cist vs 2-ME vs BSO), diferem entre si (P<0,05). Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes (^A), entre presença ou ausência de heparina (Grupo Com Heparina vs Grupo Sem Heparina) diferem entre si (P<0,05).

Figura 10- Freqüência (%) média de blastocistos de qualidade superior (MCI >20; TF>46; T>75 e MCI:TF≥1:2) produzidos sete dias após a fecundação *in vitro* em meio FIV contendo ou não antioxidantes, com sêmen capacitado ou não com heparina.

Os blastocistos de qualidade superior foram ainda, reclassificados em embriões excelentes, baseado na somatória da média geral aproximada entre o número de células da MCI (31) e desvio padrão (DP) (10,33); do TF e DP (18,90) e T e DP (25,62) (Tabela 9 e Figura 11).

Segundo os dados obtidos, não foram encontradas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os grupos (Contr, Cist, 2-ME e BSO) na presença ou ausência de heparina no meio de fecundação sobre a frequência de embriões excelentes.

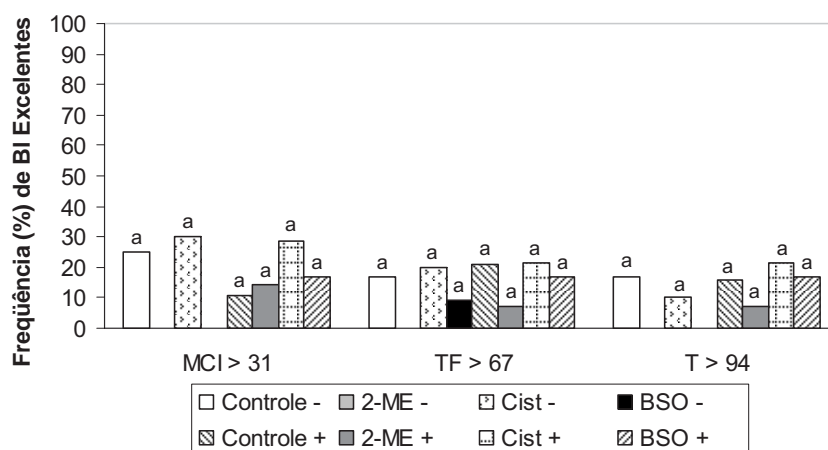
Tabela 9- Frequência (%) média de blastocistos de qualidade excelente (MCI >31; TF>67; T>94) produzidos sete dias após a fecundação *in vitro* em meio FIV contendo ou não antioxidantes, com sêmen capacitado ou não com heparina.

GRUPO		Frequência (%) média de blastocistos de qualidade excelente		
		MCI > 31	TF > 67	T > 94
SEM HEPARINA	Contr	25,0 (3/12) ^a	16,7 (2/12) ^a	16,7 (2/12) ^a
	Cist.	0,0 (0/3) ^a	0,0 (0/3) ^a	0,0 (0/3) ^a
	2-ME	30,0 (3/10) ^a	20,0 (2/10) ^a	10,0 (1/10) ^a
	BSO	0,0 (0/11) ^a	9,1 (1/11) ^a	0,0 (0/11) ^a
COM HEPARINA	Contr	10,5 (2/19) ^a	21,1 (4/19) ^a	15,8 (3/19) ^a
	Cist.	14,3 (2/14) ^a	7,1 (1/14) ^a	7,1 (1/14) ^a
	2-ME	28,6 (4/14) ^a	21,4 (3/14) ^a	21,4 (3/14) ^a
	BSO	16,7 (2/12) ^a	16,7 (2/12) ^a	16,7 (2/12) ^a

Cist = Cisteamina; 2-ME = 2-Mercaptoetanol; BSO = *DL-Buthionine Sulfoximide*.

MCI=Massa celular interna; TF=Trofocodermia; T=Total de células constituintes do embrião; MCI:TF=Proporção MCI:TF

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna (^a), e maiúsculas diferentes na linha ([^]) diferem entre si ($P < 0,05$).



Cist = Cisteamina; 2-ME = 2-Mercaptoetanol; BSO = *DL-Buthionine Sulfoximide*
 (-) Sem Heparina; (+) Com Heparina

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes (^a), entre grupos (Controle vs Cist vs 2-ME vs BSO), diferem entre si ($P < 0,05$). Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes (^A), entre presença ou ausência de heparina (Grupo Com Heparina vs Grupo Sem Heparina) diferem entre si ($P < 0,05$).

Figura 11- Frequência (%) média de blastocistos de qualidade excelente (MCI >31; TF>67; T>94) produzidos sete dias após a fecundação *in vitro* em meio FIV contendo ou não antioxidantes, com sêmen capacitado ou não com heparina.

4 DISCUSSÃO

No Exp. 1, o meio TALP-FIV (sem/com heparina) foi suplementado com antioxidantes (cisteamina e 2-mercaptoetanol) sendo posteriormente avaliadas as taxas de clivagem, de blastocistos produzidos 168 e 192 hpi e as taxas de eclosão 192 hpi. Os dados demonstraram que a suplementação com antioxidantes ou a adição ou não de heparina ao meio TAL-FIV não influenciou a porcentagem média de clivagem e o desenvolvimento dos embriões.

A análise da produção de blastocistos (BI) 168 e 192 hpi demonstrou que o antioxidante cisteamina promoveu um efeito negativo ($P < 0,05$) sobre o desenvolvimento embrionário, nesses estádios. Observou-se que nos grupos (Contr, C, 2-ME e BSO) a presença de heparina no meio TALP-FIV proporcionou um aumento significativo ($P < 0,05$) sobre a taxa de BI 168h e 192 hpi, mostrando que a adição de heparina ao meio TALP-FIV melhora o desempenho dos espermatozoides no momento da fecundação.

A avaliação dos dados sobre as taxas de eclosão revelou que não houve a influência dos antioxidantes sobre a eclosão dos blastocistos (192h), mas que a presença do antioxidante 2-ME no meio TALP-FIV/heparina pode melhorar a porcentagem de blastocistos eclodidos.

No Exp. 2, a suplementação do meio de fecundação *in vitro* com antioxidantes cisteamina e 2-ME, como também a ausência ou presença de heparina no meio TALP-FIV não influenciou a qualidade dos embriões.

Os compostos thiol, antioxidantes de baixo peso molecular, como a cisteamina e o 2-ME, quando presentes durante a MIV de oócitos bovinos e ovinos estimulam a síntese de glutathiona (GSH) e diminuem os níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) com um aumento no desenvolvimento embrionário (DE MATOS, et al., 1996; 2002; DE MATOS; FURNUS, 2000). Estes compostos, principalmente a cisteamina, quando adicionada aos meios de cultura podem ter diferentes efeitos dependendo da concentração usada, a espécie e o tipo de oócito estudado (DE MATOS et al., 1996;

2002; GRUPENT et al., 1995). Guérin et al., (2001), descreveram que a cisteamina na concentração 250 $\mu\text{M}/\text{mL}$ apresentou um efeito negativo sobre a taxa de blastocistos, sugerindo que um excesso ou redução na concentração dos compostos thiol pode ser deletério e que o equilíbrio redox é importante para a maturação do oócito e desenvolvimento embrionário. Porém, em nosso estudo, foi adicionado 50 μM de cisteamina e 2-ME ao meio TALP-FIV. Os antioxidantes não promoveram efeito sobre as taxas de clivagem, no entanto a cisteamina afetou o desenvolvimento embrionário reduzindo a produção de blastocistos. Todavia, Ali et al., (2002) demonstraram que a adição de vários antioxidantes (cisteína, catalase e superóxido dismutase ou SOD) em baixas concentrações (0,1 μM , 5 U/mL e 10 U/mL, respectivamente) no meio de FIV não promoveu efeito nas porcentagens de embriões produzidos, mas a alta concentração (0,6 mM, 127 U/mL e 100U/ml, respectivamente) desses antioxidantes reduziu significativamente as porcentagens de mórula e blastocistos produzidos. Esse mesmo estudo reportou que as altas concentrações de cisteína e catalase durante o processo da FIV reduziu significativamente as taxas de clivagem de subsequente desenvolvimento embrionário. Uma possível explicação para estes resultados seria que certos níveis de ROS são requeridos para a FIV. Outros estudos sugeriram que uma pequena quantidade de ROS pode ser necessária para uma ótima interação entre espermatozóide-oócito (BLONDIN et al., 1997) e para a capacitação espermática (AITKEN et al., 1998). No entanto, em nosso experimento o 2-ME na presença de heparina no meio de fecundação melhorou as taxas de eclosão (192 hpi) ($21,1 \pm 7,7$) em relação aos demais grupos. Takahashi et al., (2002) sugeriram que a adição de 2-ME ao meio de CIV promove o desenvolvimento embrionário, a síntese de DNA e intracelular de GSH, considerando que o 2-ME atua como um agente redutor, promovendo o crescimento e especialmente protegendo os embriões contra o estresse oxidativo. Segundo, Feugang et al, (2004) relataram que adição de 100 μM de 2-ME durante o CIV aumentou a taxa de eclosão dos blastocistos

bovinos (65%) em relação ao controle (46%), BSO (10%) e BSO associado ao 2-ME (52%).

Dalvit et al., (1996) avaliaram que a presença da vitamina E e do ácido ascórbico no meio de fecundação em bovinos prejudicou as taxas de FIV. A capacidade antioxidante da vitamina E associada ao ácido ascórbico pode prevenir a peroxidação lipídica. Há divergências à respeito dos requerimentos das ROS ou peroxidação lipídica no processo da FIV (DALVIT et al., 1996). Na FIV de camundongos e nos estágios iniciais de desenvolvimento embrionário, as ROS exercem um efeito prejudicial, e um meio pró-oxidação não é bom para esse processo (UMAOKA et al., 1992). Em humanos observou uma correlação negativa entre os níveis de geração de ROS e incidência de gestações espontâneas *in vivo* (AITKEN et al., 1991).

Blondin et al., (1997) verificaram que a adição de 1mg/mL de catalase, um antioxidante enzimático, ao meio da FIV em bovinos reduziu a motilidade espermática levando a uma baixa taxa de penetração do oócito (1-2%). Este dado sugere que certos níveis de H_2O_2 podem ser necessários durante a interação espermatozóide-oócito. Evidências demonstraram que o H_2O_2 desempenha papel crucial na capacitação espermática (AITKEN et al., 1998). Luvoni et al., (1996) adicionaram superóxido dismutase (SOD), também um antioxidante enzimático, durante a FIV e observaram uma redução significativa na porcentagem de embriões produzidos. Eles sugeriram que as espécies reativas ao oxigênio (ROS) desempenham um papel positivo durante a fertilização. Entretanto, a atividade da SOD induz aumento da concentração de H_2O_2 enquanto que diminui a de O_2^- e, assim sendo, o efeito detrimental da SOD durante a FIV deve ser atribuído à redução de O_2^- ou à elevação de H_2O_2 . No entanto, foi demonstrado que O_2^- não é responsável pela perda de motilidade do sêmen, mas H_2O_2 causa rápida diminuição da motilidade espermática em várias espécies (BILODEAU et al., 2001). Blondin et al. (1997) relataram que as ROS sobre os espermatozóides bovinos podem ter um efeito duplo. Descreveram que

o pré-tratamento do espermatozóide bovino com ROS antes da FIV reduziu consideravelmente as taxas de penetração com o oócito. Entretanto, os ânions superóxidos podem iniciar a hiperativação e capacitação de espermatozóides humanos e a produção desses radicais livres é necessária para manter esse fenômeno (DE LAMIRANDE; GAGNON, 1995 a,b).

Sikka et al. (1995) reportaram evidências sugerindo que ambos os gametas participam para o sucesso da fertilização com geração e controle de certas quantidades de ROS.

A heparina é freqüentemente adicionada ao meio de fecundação para induzir a capacitação *in vitro* (PARRISH et al., 1995). Kurosaka et al., (1990) sugeriram que a presença de heparina no meio de fecundação não apenas influenciaria a capacitação espermática com também o subseqüente desenvolvimento embrionário. Em nosso experimento pode-se observar que a presença de heparina ao meio TALP-FIV melhorou a produção de BI 168, 192 hpi ($29,0 \pm 3,5$ e $38,2 \pm 3,7$, respectivamente) e a taxa de eclosão ($11,3 \pm 2,6$) indicando que ela pode ser necessária ao processo de fecundação e subseqüente desenvolvimento do embrião. No entanto, Mendes et al., (2003) relataram que a adição de heparina ao meio de fertilização pode não ser necessária quando o sêmen criopreservado é separado via gradiente de Percoll. Levando a hipótese de que a centrifugação do sêmen criopreservado pelo Percoll pode induzir a capacitação sem heparina. Cormier et al., (1997) descreveram que o sêmen criopreservado em bovinos já estão capacitados ou capacitam mais facilmente que o sêmen à fresco. Assim, o estudo mostrou que com 6 horas de incubação, os espermatozóides são capazes de fecundar COCs na ausência de heparina. Podemos observar em nossos estudos que a taxa de clivagem se mostrou similar entre os grupos na presença ou ausência de heparina no meio TAL-FIV, corroborando com os dados do estudo anterior. Podemos hipotetizar que a criopreservação promoveu a capacitação espermática levando a interação entre os gametas no meio TALP-FIV sem heparina com a formação de zigotos.

A criopreservação muda a habilidade do espermatozóide regular os canais internos de Ca^{+} . Estes canais permanecem abertos devido à indução pela criopreservação na transição de fosfolipídeos ou reorganização de proteínas; então, o influxo de Ca^{+} pode ocorrer levando a desestabilização da membrana que promoverá a reação acrossomal. Entretanto, os espermatozóides obtidos por centrifugação no gradiente de Percoll apresentaram maiores taxas de clivagem e produção de embriões em relação aos espermatozóides obtidos por centrifugação pelo lavado ou pelo BSA (CORMIER et al., 1997). O sobrenadante das amostras de sêmen obtidas pela centrifugação pelo lavado ou pelo BSA ainda contém gema de ovo, proveniente do diluidor, enquanto as amostras de Percoll remove todo o diluidor deixando a amostra mais limpa. A gema de ovo pode dificultar o ajuste da concentração espermática. Nosso estudo sugere que o processo de preparação do sêmen para a FIV (lavado) pode ter contribuído para que as taxas de clivagem do meio TALP-FIV com heparina tenham sido similares a do grupo sem heparina.

A coloração diferencial, descrita por Iwasaki et al., (1990) pode avaliar a qualidade embrionária pela quantificação das células da MCI e do TF. (WOLF, 2005). As células embrionárias, durante o processo de desenvolvimento do embrião pré-implantação, se diferenciam em MCI e TF, sendo que as células da MCI originarão o feto, enquanto que o TF formará às membranas extra-embriônicas (NEUBER et al., 2002). O número de células do embrião determina o desenvolvimento fetal normal (LANE; GARDNER, 1997). Para assegurar a viabilidade embrionária é necessário uma proporção entre MCI:TF (FLEMING, 1987), a qual, ainda não foi estabelecida. No entanto, adota-se uma proporção de MCI:TF nos valores de 1:2 (AVELINO, 2004).

Houve uma perda significativa de embriões (51,3%), durante o processo de coloração diferencial. Dos 191 embriões produzidos, somente 93 foram avaliados ao final do processo. A remoção da zona pelúcida pela pronase e a ligação de anticorpo e complemento podem causar o

rompimento total das células promovendo a perda dos embriões submetidos à coloração diferencial (WOLF, 2005). Mas, segundo Thouas et al. (2001), esta técnica de coloração pode ser utilizada tanto para blastocistos produzidos *in vitro* em camundongos e bovinos, com zona pelúcida (ZP) intacta como para aqueles com a ZP removida .

Em nosso experimento, a cisteamina e o 2-ME não afetaram o percentual de MCI e TF quando comparados com o grupo controle. Segundo Wolf, (2005), a suplementação de cisteína associada à cisteamina ao meio de MIV não aumentou o percentual de células na MCI. Porém, Avelino (2004) descreveu que a utilização da cisteína associada à cisteamina na MIV elevou o percentual de células da MCI. Para Abeydeera et al., (1998), quando oócitos maturados foram suplementados com 0,8 mM de cisteína e 50 μ M de 2-ME, constatou-se um aumento no número de células do TF e total de blastocistos. Feugang et al., (2004) observaram um maior número de células da MCI quando o meio CIV foi suplementado com 100 μ M 2-ME.

Quando foi avaliada, em nosso experimento, a frequência de embriões de qualidade superior (MCI>20; TF>46; T> 66 e MCI:TF \geq 1:2) e excelentes (MCI>31; TF>67 e T>94) observou que os compostos thiol (Cisteamina e 2-ME) não influenciaram a produção de embriões de melhor qualidade. Porém, a suplementação de cisteamina, no meio TALP-FIV (sem heparina) promoveu um aumento na proporção de MCI:TF em relação ao grupo controle, no meio TALP-FIV (com heparina).

Segundo, Abeydeera et al., (1998), Rodrigues-González et al., (2003) e Avelino (2004) observaram um aumento de blastocistos de qualidade superior quando precursores de GSH foram adicionados ao meio de MIV. Rodrigues-González et al., (2003) observaram em cabras, que a adição ao meio de maturação de 100 μ M de cisteamina aumentou o número de células totais (T) (86,8 células), em relação ao controle (60,5 células) e também em relação ao meio adicionado 100 μ M de 2-ME (51,0 células), porém eles não avaliaram se aumento foi nas células da MCI ou do TF.

A suplementação do meio TALP-FIV com antioxidantes cisteamina ou 2-ME, não promoveu nenhum efeito sobre as taxas de clivagem e subsequente desenvolvimento embrionário (BI 168 e 192 hpi). Sobre as taxas de blastocistos eclodidos (192 hpi), a adição de 2-ME e a presença de heparina mostraram um efeito benéfico. Contudo, a heparina quando presente ao meio TALP-FIV elevou as taxas de blastocistos produzidos e juntamente com o antioxidante 2-ME melhorou o índice de eclosão, indicando que tanto a heparina quanto o 2-ME podem ser necessários para a capacitação espermática e interação entre os gametas.

A adição desses antioxidantes ao meio de fecundação também não afetou a qualidade embrionária, não influenciando o número de células da MCI, do TF, total de células do embrião e a quantidade proporcional da MCI e do TF.

5 CONCLUSÃO

- A adição de antioxidantes (cisteamina e 2-mercaptoetanol) ao meio de fecundação não influencia as taxas de formação de zigotos e subsequente desenvolvimento embrionário.
- A presença de heparina no meio de fecundação melhorou o desenvolvimento embrionário e a eclosão de blastocistos.
- O antioxidante 2-mercaptoetanol promoveu um efeito benéfico nas taxas de eclosão.
- A adição de antioxidantes ao meio de fecundação *in vitro* não afetou a qualidade embrionária, não influenciando o número de células da MCI, TF, o número total de células e a quantidade proporcional entre MCI e do TF.

6 REFERÊNCIAS

ABEYDEERA, L.R.; WANG, W.H.; CANTLY, T.C.; PRATHER, R.S.; DAY, B.N. Presence of β -mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured *in vitro* and the rate of blastocyst development after *in vitro* fertilization. **Theriogenology**, v.50, p.747-756, 1998.

ALI, A.A.; BILODEAU, J.F.; SIRARD, M.A. Antioxidants requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. **Theriogenology**, v. 59, p. 939-949, 2002.

AVELINO, K.B. **Efeitos da estimulação e inibição da síntese de glutathione durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos sobre o desenvolvimento e viabilidade embrionária.** 2004 93f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

AITKEN, R.J. A free radical theory of male infertility. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 6, n. 1, p. 19-24, 1994.

AITKEN, R.J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D.W. Relationship between iron-catalyzed lipid peroxidation potential and human sperm function. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.98, p. 257-265, 1993b.

AITKEN, R.J.; IRVINE, D.S.; WU, F.C. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. **American Journal Obstetric and Gynecology**, v.164, p. 542-551, 1991.

AITKEN, R.J.; GORDON, E.; HARKISS, D.; TWIGG, J.P.; MILNE, P. JENNINGS, Z.; IRVINE, D.S. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 1037-1046, 1998.

BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; GAGNON, C.; SIZARD, M.A. Thiols prevent H₂O₂- Mediated loss sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, v. 58, p. 275-288, 2001.

BLONDIN, P.; COENEN, K.; SIZARD, M.A. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. **Journal of Andrology**, v.18, n. 4, p. 454-460, 1997.

CORMIER, N.; SIZARD, M.A; BAILEY, J.L. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by criopreservation. **Journal of Andrology**, v. 18, n. 4, 1997.

DALVIT, G.C.; CETICA, P.D; BECONI, M.T. Effect of α -tocopherol and ascorbic acid on bovine *in vitro* fertilization. **Theriogenology**, v.49, p. 619-627, 1998.

DE LAMIRANDE ,E.; GAGNON C. Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. **Free Radical Biology**, v.18, p. 487-495, 1995a.

DE LAMIRANDE ,E.; GAGNON C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. **Human Reproduction**, v.10, p. 15-21, 1995b.

BAVISTER, B.D., ROSE-HELLEKANT, T.A., PINYOPUMMINTR, T. Development of *in vitro* matured / *in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. **Theriogenology**, v.37, p. 127-146, 1992.

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 beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. **Theriogenology**, v.53, p.761-771, 2000.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C.; MOSES, D.F.; MARTINEZ, A.G.; MATKOVIC, M. Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. **Molecular Reproduction and Development**, v.45, p.451-457, 1996.

DODE, M.A.N.; RODOVALHO, N.C.; UENO, V.G.; FERNANDES, C.E. The effect of sperm preparation and co-incubation time on *in vitro* fertilization of *bos indicus* oocytes. **Animal Reproduction Science**, v.69, p. 15-23, 2002.

DUTY, S.M.; SINGH, N.P.; RYAN, L.; CHEN, Z.; LEWIS, C.; HUANG, T.;HAUSER, R. Realiability of the comet assay in cryopreserved human sperm. **Human Reproduction**, v. 17,n. 5, p. 1274-1280, 2002

FEUGANG, J.M.; DE ROOVER, R.; LÉONARD, A.M.S.; DESSY, F.; DONNAY, I. Addition of β -mercaptoethanol or trolox at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidants agents. **Theriogenology**, v.61, n.1, p. 71-90, 2004

FLEMING, T.P. A quantitative analysis of cell allocation to trophectoderm and inner cell mass in the mouse blastocyst. **Developmental Biology**, v. 119, n. 2, p. 520-531, 1987.

GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. Cambridge: Cambridge University Press, 1994, p.30-142.

GRUPEN, C.G.; NAGASHIMA, H.; NOTTLE, M.B. Cysteamine enhance *in vitro* development of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 153-157, 1995.

GUÉRIN, P.; MOUATASSIN, S.EL.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction**, v. 7, p. 175-89, 2001.

IWASAKI, S.; YOSHIBA, N.; USHIJIMA H.; WATANABE,S.; NAKARARA, T. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.90, p. 279-285, 1990.

KUROSAKA, S.; TAKAI, K.; KITA, M.; TACHIURA, G.; KANO, J. Effect of on bovine oocytes development in culture during and after *in vitro* fertilization. **Japanese Journal of Animal Reproduction**, v. 36, p. 241, 244, 1990.

LANE , M.; GARDNER, D.K. Nonessential amino acids and glutamine decrease the time of the first three cleavage divisions and increase compaction of mouse zygotes *in vitro*. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 14, n.7, p. 398-403, 1997.

LITTLELL, R.C.; MILLIKEN, G.A.; STROUP, W.W.; WOLFINGER, R.D. **SAS system for mixed models**. Cary, NC, USA: SAS: Institute Inc., 1996, 633p.

LIU, Z.; FOOTE, R.H. Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O₂. **Biology of Reproduction**, v.53, p.786-790, 1995.

LUVONI, G.C.; KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B.G. Improvement of bovine embryo production *in vitro* by glutathione-containing medium. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 43, p. 437-443, 1996.

MENDES JUNIOR, J.O.B.; BURNS, P.D.; DE LA TORRE-SANCHEZ, J.F.; SEIDEL JUNIOR, G.E. Effect of heparin on cleavage rates and embryo production with four bovine sperm preparation. **Theriogenology**, v.60, p. 331-340, 2003.

NASR-ESFAHANI, M.H.; AITKEN, J.R.; JOHNSON, M.H. Hydrogen peroxide levels in mouse oocyte and early cleavage stages embryos developed *in vitro* or *in vivo*. **Development**, v.109, p.501-507, 1990.

NEUBER, e.; LUTETJENS, C.M.; CHAN, A.W.S.; SCHATTEEN, G.M. Analysis of DNA fragmentation of *in vitro* cultured bovine blastocysts using TUNEL. **Theriogenology**, v. 57, p. 2193-2202, 2002.

PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J.L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of *in vitro*

fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, p. 859-869, 1995.

RODRIGUEZ-GONZÁLES, E.; LÓPEZ-BEJAR, M.; MERTENS, M.J.; PARAMIO, M.T. Effects on *in vitro* embryo development and intracellular glutathione content of the presence of thiol compounds during maturation of prepubertal goat oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 65, p. 446-453, 2003.

SALAMON, S; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram II semen Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, v.38, p.1-36, 1995.

SIKKA, S.C; RAJASEKARAN, M.; HELLSTROM, W.J.G. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. **Journal of Andrology**, v. 16, p. 464-468, 1995.

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

TAKAHASHI, M.; NAGAI, T.; OKAMURA, N.; TAKAHASHI, H.; OKANO, A. A promoting effect of β -mercaptoethanol on *in vitro* development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v. 6, p. 562-567, 2002.

THOUAS, G.A.; KORFIATIS, N.A.; FRENCH, A.J.; JONES; G.M.; TROUNSON, A.O. Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. **Reproductive BioMedicine**, v.3, n. 1, p.25-29, 2001.

UMAOKA, Y.; NODA, Y.; NARIMOT, K.; MORI, T. Effect of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.32, p. 28-33, 1992.

WOLF, A. **Estímulo da síntese de glutathione na maturação *in vitro* de oócitos bovinos e sua influência no desenvolvimento embrionário**. 2005 101f., Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE ANTIOXIDANTES ADICIONADOS AO MEIO DE FECUNDAÇÃO *IN VITRO* SOBRE O ESPERMATOZÓIDE BOVINO PELA ASSOCIAÇÃO DE SONDAS FLUORESCENTES

RESUMO – Apesar do grande número de pesquisas serem voltadas para os efeitos protetores dos antioxidantes na criopreservação do espermatozóide, poucos estudos envolvendo seus efeitos sobre a interação da célula espermática com oócito na fecundação *in vitro* (FIV) têm sido conduzidos. Sendo assim, o objetivo desse experimento foi avaliar os efeitos protetores contra as ROS dos antioxidantes cisteamina (Cist) e 2-mercaptoetanol (2-ME) adicionados ao meio de fecundação sobre a integridade das membranas plasmática, acrossomal, do DNA e da função mitocondrial dos espermatozóides bovinos. Oócitos foram maturados *in vitro* (MIV) por 24h a 38,5°C e 5% de CO₂ em meio TCM-199 suplementados com 10% SFB). O meio de fecundação foi o TALP suplementado ou não com 10 µg de heparina e 160 µL da solução de PHE (denominados respectivamente de TALP-FIV/Hep+PHE ou TALP-FIV) que, dependendo do grupo experimental, foram suplementados com 50 µM de 2-Mercaptoetanol (2-ME), ou 50 µM de Cisteamina (Cist) ou 5 mM de *DL-Buthionine-Sulfoximine* (BSO) ou não receberam suplementação (CONTROLE). Durante a FIV, nos tempos 0 e 4 horas, foi coletada uma amostra de sêmen da placa de fertilização para a avaliação da integridade das membranas plasmática, acrossomal e função mitocondrial pelas sondas fluorescentes (PI, FITC-PSA e JC-1) (Exp.1) e integridade da cromatina por fluorocromo (AO) (Exp.2). No Exp.1, houve uma queda ($P<0,05$) nas médias de espermatozóides que preservaram a integridade de membrana plasmática durante o tempo (0 e 4 horas durante a FIV). O 2-ME apresentou dados significativamente menores ($P<0,05$) no tempo 4 horas no meio TALP-FIV sem heparina em relação ao mesmo meio no tempo 0 hora tanto para integridade acrossomal quanto para o potencial

mitocondrial. No Exp.2, não houve diferença entre as médias sobre integridade da cromatina tanto entre os grupos, entre os tempos e entre os meios TALP-FIV. Não houve efeitos dos antioxidantes em preservar a integridade das membranas plasmática, acrossomal e função mitocondrial. Os espermatozóides apresentaram o DNA íntegro quase na totalidade entre os diferentes tratamentos e durante o tempo no processo da FIV.

Palavras-chave: Antioxidantes, FIV, espermatozóides, sondas fluorescentes, DNA, bovino.

1 INTRODUÇÃO

Muito embora tenham sido investigados os efeitos protetores de antioxidantes na criopreservação de espermatozóides, poucos estudos foram conduzidos avaliando-se seus efeitos sobre os espermatozóides e sobre sua interação com o oócito durante o processo de fecundação *in vitro* (FIV). Foi demonstrado que a adição de superóxido dismutase (SOD) no meio de FIV reduziu a porcentagem de embriões obtidos (ALI et al., 2003; LUVONI et al., 1996;), o que sugere uma possível ação positiva das ROS durante a FIV. Entretanto, deve ser salientado que a atividade da SOD induz aumento da concentração de H_2O_2 enquanto que diminui a de O_2^- e, assim sendo, deve ser investigado se o efeito detrimental da SOD durante a FIV deve ser atribuído à redução de O_2^- ou à elevação de H_2O_2 . Já foi demonstrado que O_2^- não é responsável pela perda de motilidade do espermatozóide, mas H_2O_2 causa rapidamente diminuição da motilidade espermática em várias espécies (BILODEAU et al., 1999; BILODEAU et al., 2001; IGNOTZ et al, 2001). A produção de H_2O_2 deve-se ao metabolismo do espermatozóide e à aminoácido-oxidase liberada dos espermatozóides mortos (BILODEAU et al., 2000). Outro efeito prejudicial do H_2O_2 ocorre quando há sua reação com metais (Fe, Cu), o que induz a formação de mais ROS, como por exemplo, OH^- que causa danos de DNA e proteínas (TOSIC, 2001).

Por outro lado, vários trabalhos têm demonstrado que a capacitação parece ser parte de um processo oxidativo e O_2^- parece participar da hiperativação e capacitação do espermatozóide (DE LAMIRANDE; GAGNON, 1993; FLAHERTY et al, 1997; FLAHERTY et al, 1999) e, devido a isto, a adição de antioxidantes ao meio de capacitação do espermatozóide não tem sido recomendada. Durante o processo de capacitação, espermatozóides de mamíferos adquirem a capacidade de fecundar os oócitos. Este processo é associado à remoção de colesterol, o que eleva a fluidez da membrana (LANGLAIS et al., 1988), influxo de cálcio

(SINGH et al., 1978), aumento da concentração de cAMP (WHITE et al., 1989) e alterações em atividades enzimáticas, tal como a proteína quinase C (PKC) que está envolvida em mecanismos de transdução de sinais que promovem a indução da reação acrossomal (FURUYA et al., 1993). Estas alterações bioquímicas promovem uma alteração transitória no padrão da motilidade do espermatozóide, denominada hiperativação (YANAGIMACHI et al., 1974). O processo preparatório conclui-se com um evento de excitose denominado reação acrossomal, que é um estágio essencial para a fertilização do oócito (FLAHERTY et al., 1999; ROLDAN et al., 1990). Muito embora haja relatos de que O_2^- seja benéfico para a capacitação espermática, a presença de H_2O_2 no meio parece ser responsável pela indução prematura da reação acrossomal (HSU et al., 1999).

Métodos para avaliar a qualidade do sêmen antes da inseminação ou depois de tratamento experimental em laboratório são desenvolvidos para estimar com acurácia a fertilidade (GRAHAM et al., 1990). Os métodos clássicos para avaliação da viabilidade dos espermatozoides são estimar a porcentagem de motilidade progressiva das células usando o microscópio. A combinação de corantes fluorescentes organela-específica e citometria de fluxo mostraram ser um rápido e preciso teste para analisar milhares de espermatozoides individualmente em cada amostra de sêmen (GRAHAM et al., 1990).

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de antioxidantes (CSH e 2-ME) sobre a integridade das membranas plasmática, acrossomal, função mitocondrial e os danos ao DNA em espermatozoides bovinos expostos às condições naturais de espécies reativas ao oxigênio (ROS) produzidas durante a FIV.

2 MATERIAL E MÉTODO

2.1 Obtenção e seleção dos oócitos

Os ovários bovinos coletados em abatedouro, situado na cidade de Birigui/SP foram transportados ao laboratório em solução salina a 30-33°C e seus folículos antrais de 3 a 8 mm de diâmetro foram aspirados por agulha de 18-G acoplada à seringa de 20 mL. O fluido folicular aspirado foi transferido para tubo cônico de 50 mL e decantado por 15 minutos para a separação dos oócitos. Posteriormente, o sedimento foi transferido para placa de poliestireno de 60 mm de diâmetro e avaliado em microscópio estereoscópico. Foram selecionados complexos-*cumulus*-oócito (COCs) com coloração uniforme do ooplasma e que possuíam *cumulus* compacto com pelo menos 4 camadas de células.

2.2 Maturação *in vitro*

Os COCs selecionados foram lavados duas vezes em meio de lavagem H-199 (constituído por meio TCM-199, suplementado com 0,2 mM de Piruvato, 20 mM de HEPES, 5 mM de Bicarbonato de sódio, 75µg de Sulfato de amicacina/mL) e uma vez em meio de maturação B-199 (constituído por meio TCM-199 suplementado com 0,2 mM de Piruvato, 25 mM de Bicarbonato de Sódio, 75µg de Sulfato de amicacina/mL, 1 µg de 17-β Estradiol/mL, 500 UI de FSH/mL, 100 UI de hCG/mL) acrescido de 10% de SFB. Foram transferidas 20 estruturas/microgota de 100 µl. Os oócitos foram maturados durante 24 horas em estufa a 38,5°C, 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

2.3 Fecundação *in vitro*

A fecundação foi realizada 24 horas após o início do cultivo de maturação. Três palhetas de sêmen de um único touro e da mesma partida foram descongeladas à temperatura de 35-37°C por 30 segundos, e lavadas por três vezes em 2mL de meio TL-Sêmen (WOLF, 2005) cada vez,

adicionado de antibiótico (2µL/mL de Sulfato de amicacina-250mg) e 2µL/mL de Piruvato sódico (100mM), por centrifugação a 750 rpm durante 5 minutos.

O sedimento recuperado foi avaliado quanto ao volume, concentração e motilidade espermática. A concentração final foi ajustada para 25×10^6 espermatozoides por mL de meio de fecundação TALP-FIV (BAVISTER,1989) .



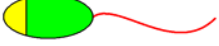
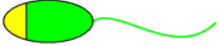

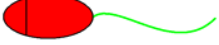

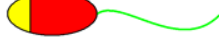
De acordo com o grupo experimental, o TALP-FIV foi (TALP-FIV/Hep+PHE) ou não foi (TALP-FIV) suplementado com 10 µg de heparina e 160 µL da solução de PHE, segundo Bavister, (1989). Ainda dependendo do grupo experimental, o TALP-FIV ou TALP-FIV/Hep+PHE utilizado foi o padrão do laboratório (CONTROLE) ou foi suplementado com 50 µM de 2-Mercaptoetanol (2-ME), ou 50 µM de Cisteamina (C) ou 5 mM de DL-Buthionine-Sulfoximine (BSO). Aproximadamente 100×10^3 espermatozoides foram adicionados a cada “poço” de 1,5 mL de meio TALP-FIV, correspondendo a 4×10^3 espermatozoides por oócito, designado a cada grupo experimental. Os oócitos foram lavados duas vezes em meio H-199, suplementado com 0,5% de BSA livre de ácidos graxos, e uma vez em meio TALP-FIV, sendo a seguir transferidos para a gota de FIV. Foram adicionados 20 oócitos por gota de FIV, que foram co-incubados com os espermatozoides a 38,5C°, por 18 a 20 horas em atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

Foi colhida uma alíquota de sêmen (500 µL) de cada “poço” da placa de fecundação imediatamente após a diluição do sêmen no meio TALP-FIV (tempo 0 hora) e 4 horas após o início do cultivo de fecundação. Os espermatozoides destas alíquotas foram imediatamente avaliados quanto à integridade de membrana, acrossomo, função mitocondrial e integridade da cromatina.

2.4 Avaliação da integridade das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial

Os parâmetros do espermatozóide como, a integridade das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial foram avaliados de acordo com protocolo descrito por Arruda (2003a) e por Celeghini (2004; 2005), pela associação das sondas iodeto de propídio (PI; Sigma, 28707-5), aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA; Sigma L-0770) e JC1 (Molecular Probes, T-3168). Para análise, foram retiradas alíquotas de 500µL de meio FIV de cada grupo, diretamente dos “poços” da placa de cultivo. As alíquotas foram colhidas imediatamente após o início do cultivo de fecundação (tempo 0 hora) e 4 horas após (tempo 4 horas), sendo imediatamente transferidas para microtubos e submetidas a centrifugação 750g durante 5 minutos. Em seguida, foi retirada uma amostra (30µL) do sedimento formado de cada grupo, e colocada em microtubo ao qual foi adicionado 2 µL de PI (0,2 mg/mL), 1,6 µL de JC-1 0,5 mg/mL) e 10 µL de FITC-PSA (100 µg/mL). Após a adição das sondas fluorescentes, utilizou-se uma gota (10µL) destas amostras para preparações úmidas, entre lâmina e lamínula (pré-aquecidas a 37°C). A leitura foi realizada imediatamente sob microscopia de epifluorescência (microscópio Olympus IX 51 - Japão) em filtro com excitação de 460-570 nm e emissão de 460-610 nm. Foram contadas 100 células e classificadas de acordo com a fluorescência emitida por cada sonda utilizada (PI, FITC-PSA e JC-1) que resultaram em oito categorias de células, descritas na Tabela 1.

Tabela 1- Classificação das células espermáticas de acordo com a coloração fluorescente emitida no protocolo de associação de PI, FITC-PSA e JC-1 (Segundo CELEGHINI, 2005).

CÉLULA ESPERMÁTICA	PI	FITC-PSA	JC-1	Espermatozóide
Membrana plasmática intacta, com acrossomo intacto e com alto potencial de membrana mitocondrial (IIC)	-	-	vermelho	
Membrana plasmática intacta, com acrossomo intacto e com baixo potencial de membrana mitocondrial (IIS)	-	-	verde	
Membrana plasmática intacta, com acrossomo lesado e com alto potencial de membrana mitocondrial (ILC)	-	+	vermelho	
Membrana plasmática intacta, com acrossomo lesado e com baixo potencial de membrana mitocondrial (ILS)	-	+	verde	
Membrana plasmática lesada, com acrossomo intacto e com alto potencial de membrana mitocondrial (LIC)	+	-	vermelho	
Membrana plasmática lesada, com acrossomo intacto e com baixo potencial de membrana mitocondrial (LIS)	+	-	verde	
Membrana plasmática lesada, com acrossomo lesado e com alto potencial de membrana mitocondrial (LLC)	+	+	vermelho	
Membrana plasmática lesada, com acrossomo lesado e com baixo potencial de membrana mitocondrial (LLS)	+	+	verde	

OBS. PI positivo (+) = núcleo corado em vermelho
FITC-PSA positivo (+) = região do acrossomo verde-amarelada

2.5 Integridade da Cromatina

A análise da estrutura da cromatina foi realizada pela técnica descrita por Evenson et al., (1980); Tejada et al. (1984) e modificada por Unanian, (2000), utilizando o corante fluorescente laranja de acridina, um corante metacromático de DNA que permite a detecção da fragmentação do DNA por código de cor.

Para análise, foram retiradas alíquotas de 500µL dos “poços” da placa de fecundação, para cada grupo. As alíquotas foram colhidas

imediatamente após a diluição sêmen no meio TALP-FIV e início da co-incubação dos espermatozóides e oócitos (tempo 0 hora) e 4 horas após o início do cultivo de fecundação. As alíquotas foram colocadas em microtubos, sendo submetidas à centrifugação 750rpm durante 5 minutos. Em seguida, foi retirada uma amostra (30µL) do sedimento formado de cada grupo, para o preparo de esfregaços que foram deixados secar a temperatura ambiente durante 60 minutos. Os esfregaços foram imersos em Solução de Carnoy (3 partes de metanol para 1 parte de ácido acético) para a fixação “overnight”. As lâminas foram secas a temperatura ambiente e posteriormente cobertas com 3 mL da solução de acridina laranja (10mL da solução de solução de acridina laranja 1µg/mL + 40 mL de solução de ácido cítrico 0,1 M + 2,5 mL de solução de fosfato dissódico 0,3 M; pH 2-3), de modo a permanecerem coradas por 5 minutos em ambiente escuro. Os esfregaços foram lavados cuidadosamente em água destilada e antes de secar foram cobertas por lamínulas (24 x 40mm). As lâminas foram examinadas em microscópio de epifluorescência (microscópio Olympus IX 51 - Japão) em filtro com excitação de 460-570 nm e emissão de 460-610 nm. Para cada esfregaço foram contadas 100 células e classificadas de acordo com Tejada et al., (1984), sendo que as células que emitiram fluorescência verde foram consideradas normais, ou seja, com cromatina íntegra, enquanto, as células que emitiram fluorescência vermelha, laranja, amarela distribuídas de forma regular ou irregular no interior da cabeça foram considerados anormais, pois denotam desnaturação total ou parcial da cromatina.

2.6 Delineamento Experimental

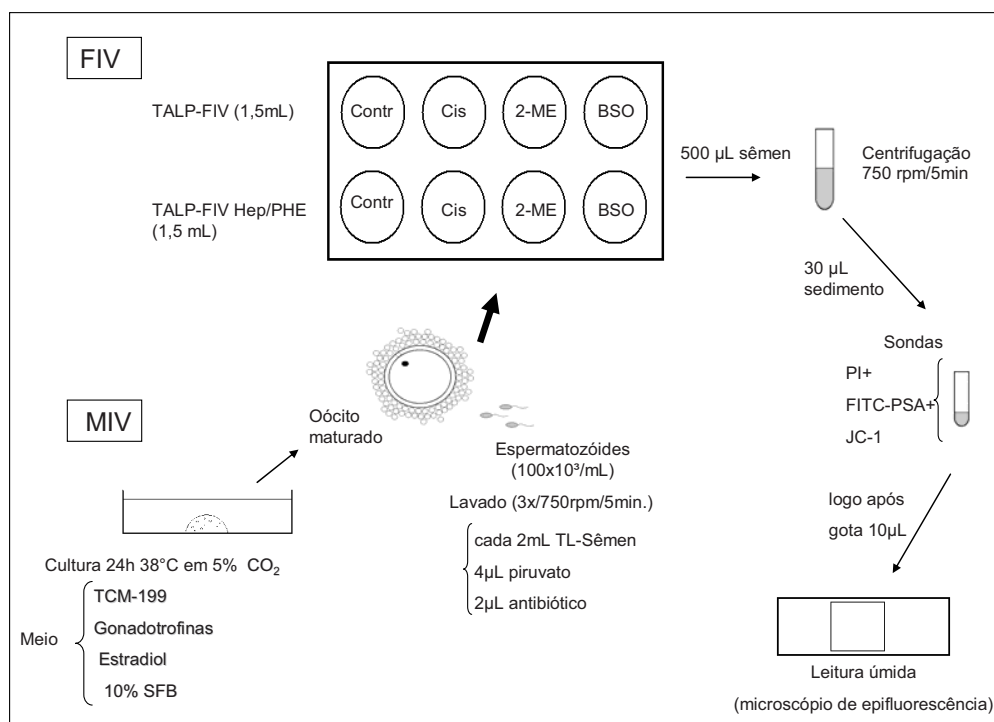
Foram realizados dois experimentos com no mínimo 4 repetições cada. Os reagentes e meios foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO). As estufas foram calibradas para a temperatura de 38,5 °C com 5% CO₂ em ar e humidade máxima durante todo o experimento. Os grupos experimentais estão esquematizados na Tabela 2 e descritos abaixo.

Tabela 2- Preparação dos meios de maturação, fecundação e cultivo *in vitro*.

Meio MIV	Meio FIV		Meio CIV	
TCM 199 + 0,2 mM piruvato, 25 mM bicarbonato de sódio, 75 µg amicacina/ml, + 17 β estradiol/ml, 500 UI FSH/mL, 100 UI de LH/mL 10% de SFB	TALP-FIV +Heparina (10 µg) / PHE (160 µL)	C	0,6% de BSA	SOF aa + 0,5% de BSA 2,5 % de SFB
		CIS	0,6% de BSA + 50 µM de Cisteamina	
		2-ME	0,6% de BSA + 50 µM de 2-Mercaptoetanol	
		BSO	0,6% de BSA + 5 mM DL-Buthionine	
	TALP-FIV	C	0,6% de BSA	
		CIS	0,6% de BSA + 50 µM de Cisteamina	
		2-ME	0,6% de BSA + 50 µM de 2-Mercaptoetanol	
		BSO	0,6% de BSA + 5 mM DL-Buthionine	

2.6.1 Experimento 1 – Avaliação da integridade das membranas plasmática, acrossomal, e potencial mitocondrial .pela associação de sondas fluorescentes

Os procedimentos experimentais estão sumarizados na Figura 1. Neste experimento foram utilizados 582 oócitos e realizadas 4 repetições.

**Figura 1-** Esquema fecundação *in vitro* (FIV).

2.6.2 Experimento 2 – Avaliação da Integridade da Cromatina

Os procedimentos experimentais estão descritos na Figura 2. Neste experimento foram utilizados 740 oócitos e foram realizadas 5 repetições.

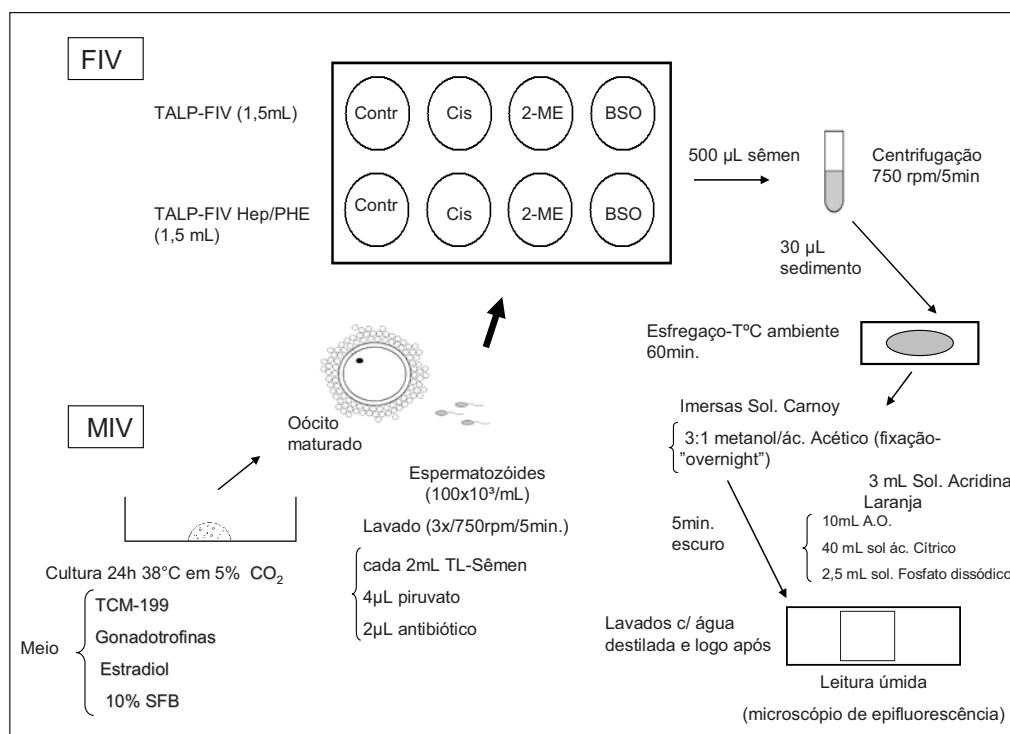


Figura 2- Esquema da fecundação *in vitro* e coloração da cromatina espermática com "Acridine Orange" (AO).

2.7 Análise Estatística

Para avaliar o efeito da suplementação do meio de FIV sobre a integridade da membrana citoplasmática, acrossoma, potencial mitocondrial e integridade da cromatina, os dados foram analisados pela fração de espermatozoides classificados de acordo com os parâmetros avaliados, em termos de porcentagem (%). Como a porcentagem de espermatozoides não obteve distribuição normal, os dados foram transformados em $\text{arc sem } \sqrt{\%}$. Foi aplicada Análise de Variância considerando-se um experimento fatorial para verificação de diferenças entre tratamentos (suplemento do meio de fecundação), presença ou ausência de heparina, tempo e suas interações.

Posteriormente foi aplicado teste de Tukey para comparação múltipla das médias.

O nível de significância adotado foi de 5%. A análise estatística foi efetuada empregando-se o programa “Statistical Analysis System” (Sas Institute Inc, 1989), SAS\STAT Software, Release 8.2. Cary: SAS Institute Inc. (LITTLELL et al., 1996).

3. RESULTADO

3.1 Experimento 1 – Avaliação da integridade das membranas plasmática, acrossomal, e potencial mitocondrial, pela associação de sondas fluorescentes.

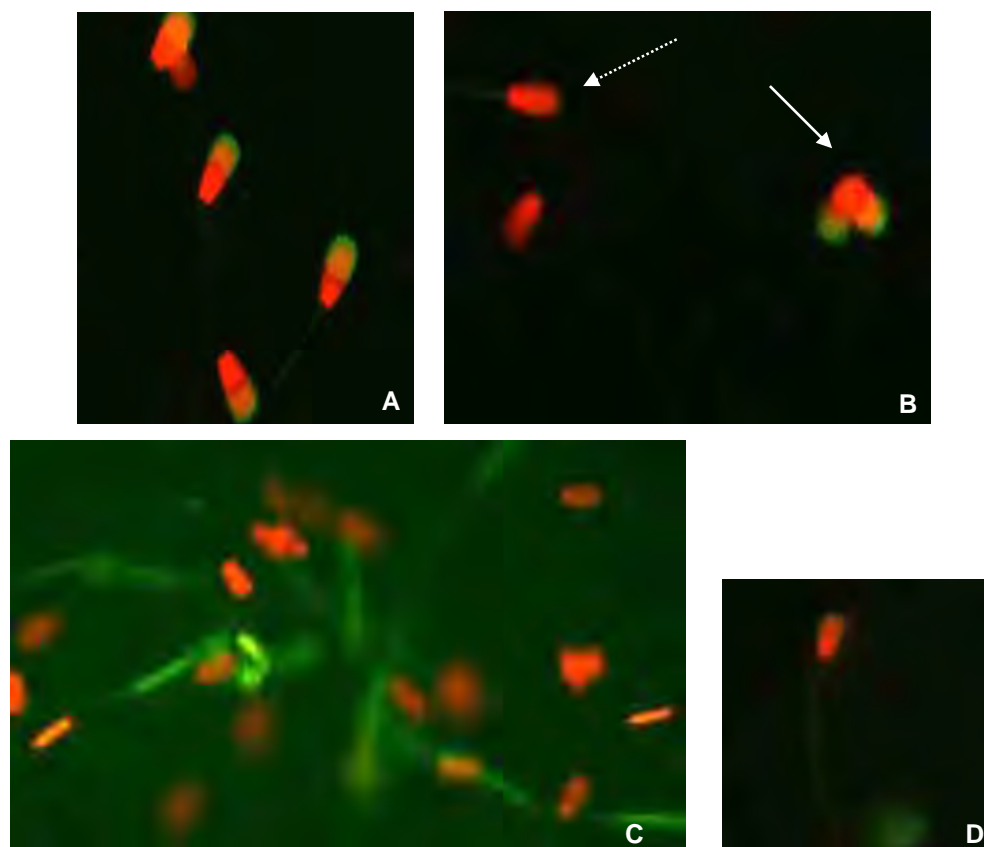


Figura 3- Fotomicrografia de epifluorescência das células espermáticas coradas com associação das sondas fluorescentes PI, FITC-PSA e JC-1. **A.** Células com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e sem potencial mitocondrial (LLS) **B.** Células com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e sem potencial mitocondrial (LLS) (seta) e células com membrana plasmática lesada, acrossomo íntegro e sem potencial mitocondrial (LIS) (seta tracejada) **C.** Células com membrana plasmática lesada, acrossomo íntegro e sem potencial mitocondrial (LIS) (vermelhas) e células com membrana plasmática íntegra, acrossomo íntegro e sem potencial mitocondrial (IIS) (verdes) **D.** Células com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e sem potencial mitocondrial (LLS). Imagens digitalizadas.

As porcentagens de espermatozoides com membrana plasmática íntegra, acrossomo íntegro e com função mitocondrial (IIC) estão representadas na Tabela 3 e Figura 4. Não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre os grupos (Contr, Cist, 2-ME e BSO), como também nenhuma diferença significativa ($P>0,05$) entre cada tempo (0h e 4h). Contudo, houve diferença significativa ($P<0,05$) entre o meio TALP-FIV na presença de heparina em relação ao meio TALP-FIV na ausência de heparina. Nos dois momentos (0h e 4h) na presença de heparina houve uma diminuição nas porcentagens de espermatozoides com membrana plasmática íntegra, acrossomo íntegro e com função mitocondrial.

As porcentagens de espermatozoides com membrana plasmática íntegra, acrossomo íntegro e sem função mitocondrial (IIS) estão representadas na Tabela 4 e Figura 5. Não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre os grupos dentro de cada tempo (0 hora e 4 horas), assim como não houve diferença significativa ($P>0,05$) na ausência ou presença de heparina sobre a viabilidade das membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial. Porém, foi significativa ($P<0,05$) a diminuição dessas porcentagens entre os grupos no tempo 4 horas em relação ao tempo 0 hora.

Tabela 3- Porcentagem média de espermatozoides com membrana plasmática intacta, acrossoma intacto e com alto potencial de membrana mitocondrial (IIC) durante a fecundação *in vitro* em meio contendo ou não antioxidantes, na presença ou ausência de heparina.

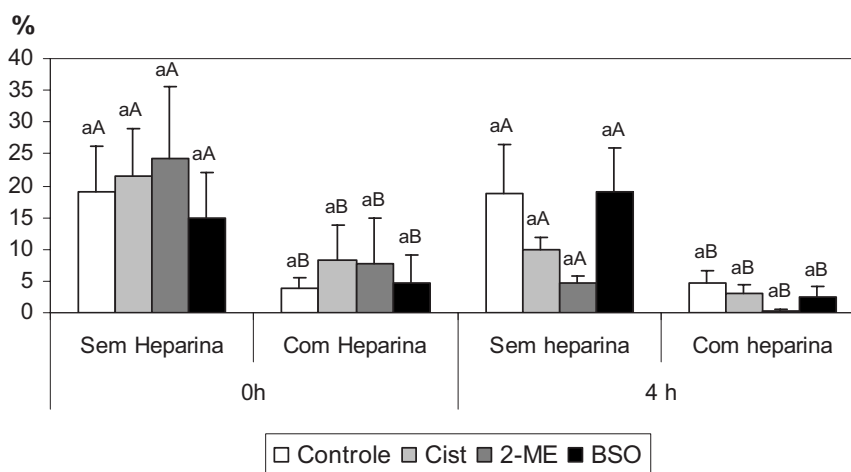
Grupo	IIC (%Média ± EPM)			
	0 h		4 h	
	Sem heparina	Com heparina	Sem heparina	Com heparina
Controle	19,0 ± 7,1 ^{aA}	4,0 ± 1,5 ^{aB}	18,8 ± 7,6 ^{aA}	4,7 ± 1,8 ^{aB}
Cist.	21,5 ± 7,6 ^{aA}	8,3 ± 5,5 ^{aB}	10,0 ± 2,0 ^{aA}	2,9 ± 1,4 ^{aB}
2-ME	24,3 ± 11,2 ^{aA}	7,7 ± 7,3 ^{aB}	4,8 ± 0,9 ^{aA}	0,3 ± 0,3 ^{aB}
BSO	14,9 ± 7,2 ^{aA}	4,8 ± 4,4 ^{aB}	19,0 ± 6,8 ^{aA}	2,5 ± 1,6 ^{aB}

Cist = Cisteamina; 2-ME = 2-Mercaptoetanol; BSO = *DL-Buthionine Sulfoximide*

^{ab} Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,05) (Comparando grupos).

^{AB} Letras maiúsculas diferentes na mesma linha, para cada grupo, dentro do mesmo tempo, diferem entre si (p<0,05) (Comparando presença ou ausência de heparina).

* Médias seguidas de asterisco, na linha, no tempo 4h, diferem em relação ao mesmo grupo no tempo 0h (P < 0,05) (Comparando tempos).



Cist = Cisteamina; 2-ME = 2-Mercaptoetanol; BSO = *DL-Buthionine Sulfoximide*

Figura 4- Representação gráfica da porcentagem média de espermatozoides com membrana plasmática íntegra, acrossoma íntegro e com potencial mitocondrial (IIC) durante fecundação em meio suplementado com antioxidantes (Cisteamina - Cist ou 2-Mercaptoetanol - 2-ME) ou com um inibidor da síntese de glutatona (*DL-Buthionine Sulfoximide* - BSO), na ausência ou presença de heparina, nos tempos 0 hora e 4 horas após o início da FIV.

Tabela 4- Porcentagem média de espermatozoides com membrana plasmática íntegra, acrossomo íntegro e sem potencial mitocondrial (IIS) durante a fecundação *in vitro* em meio contendo ou não antioxidantes, na presença ou ausência de heparina.

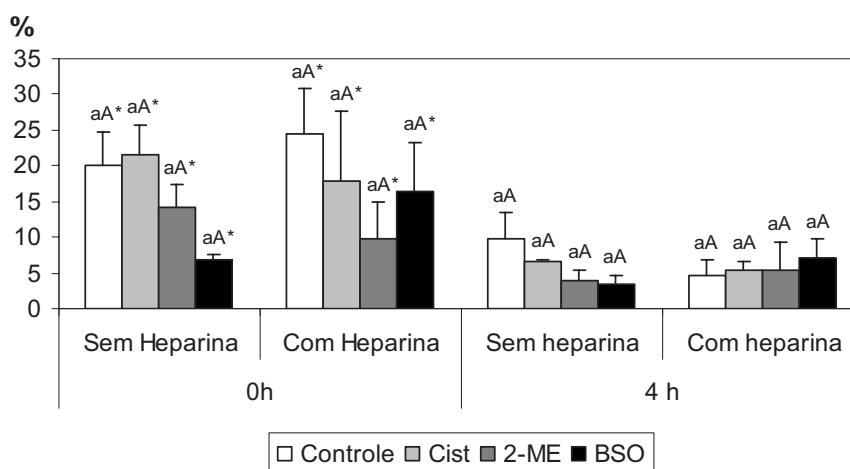
Grupo	IIS (Média ± EPM)			
	0 h		4 h	
	Sem heparina	Com heparina	Sem heparina	Com heparina
Controle	20,0 ± 4,8 ^{aA*}	24,5 ± 6,4 ^{aA*}	9,9 ± 3,6 ^{aA}	4,7 ± 2,1 ^{aA}
Cist.	21,5 ± 4,2 ^{aA*}	17,8 ± 9,9 ^{aA*}	6,5 ± 0,3 ^{aA}	5,3 ± 1,2 ^{aA}
2-ME	14,3 ± 3,2 ^{aA*}	9,8 ± 5,1 ^{aA*}	3,8 ± 1,6 ^{aA}	5,3 ± 4,1 ^{aA}
BSO	6,9 ± 0,7 ^{aA*}	16,3 ± 7,0 ^{aA*}	3,5 ± 1,2 ^{aA}	7,1 ± 2,8 ^{aA}

Cist = Cisteamina; 2-ME = 2-Mercaptoetanol; BSO = *DL-Buthionine Sulfoximide*

^{ab} Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,05) (Comparando grupos).

^{AB} Letras maiúsculas diferentes na mesma linha, para cada grupo, dentro do mesmo tempo, diferem entre si (p<0,05) (Comparando presença ou ausência de heparina).

* Médias seguidas de asterisco, na linha, no tempo 4h, diferem em relação ao mesmo grupo no tempo 0h (P < 0,05) (Comparando tempos).



Cist = Cisteamina; 2-ME = 2-Mercaptoetanol; BSO = *DL-Buthionine Sulfoximide*

Figura 5- Representação gráfica da porcentagem média de espermatozoides com membrana plasmática íntegra, acrossomo íntegro e sem potencial mitocondrial (IIS) durante fecundação em meio suplementado com antioxidantes (Cisteamina - Cist ou 2-Mercaptoetanol - 2-ME) ou com um inibidor da síntese de glutathione (*DL-Buthionine Sulfoximine* - BSO), na ausência ou presença de heparina, nos tempos 0 hora e 4 horas após o início da FIV.

As porcentagens de espermatozóides com membrana plasmática íntegra, acrossomo lesado e com função mitocondrial (ILC) estão representadas na Tabela 5 e Figura 6. Como esse padrão não foi encontrado com frequência as médias não apresentaram resultados estatísticos. Numericamente pode-se observar uma diminuição de espermatozóides com membrana plasmática íntegra, acrossomo lesado e com potencial mitocondrial no grupo 2-ME no tempo 0 horas na presença de heparina, como também o surgimento desse padrão no grupo Cist no tempo 4 horas na presença de heparina.

As porcentagens de espermatozóides com membrana plasmática íntegra, acrossomo lesado e sem função mitocondrial (ILS) estão representadas na Tabela 6 e Figura 7. Numericamente, houve um aumento da porcentagem de espermatozóides com esse tipo padrão (ILS) no tempo 4 horas na presença de heparina nos grupos Cist e BSO, mas as médias não apresentaram resultados estatísticos significativos. Os dados demonstram, para estes grupos, um aumento no número de espermatozóides que preservaram a integridade da membrana plasmática, com acrossomo lesado e sem função mitocondrial.

Tabela 5- Porcentagem média de espermatozóides com membrana plasmática íntegra, acrossomo lesado e com potencial mitocondrial (ILC) durante a fecundação *in vitro* em meio contendo ou não antioxidantes, na presença ou ausência de heparina.

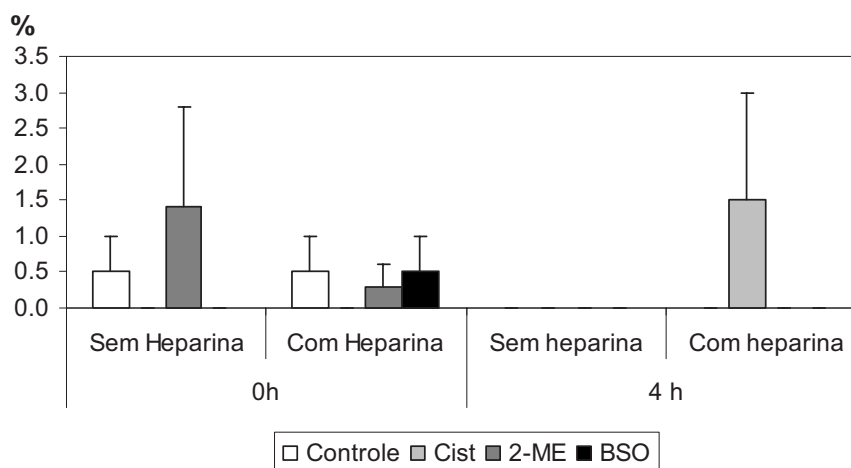
Grupo	ILC (Média ± EPM)			
	0 h		4 h	
	Sem heparina	Com heparina	Sem heparina	Com heparina
Controle	0,5 ± 0,5	0,5 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Cist.	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,5 ± 1,5
2-ME	1,4 ± 1,4	0,3 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
BSO	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

Cist = Cisteamina; 2-ME = 2-Mercaptoetanol; BSO = *DL-Buthionine Sulfoximide*

^{ab} Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$) (Comparando grupos).

^{AB} Letras maiúsculas diferentes na mesma linha, para cada grupo, dentro do mesmo tempo, diferem entre si ($p < 0,05$) (Comparando presença ou ausência de heparina).

* Médias seguidas de asterisco, na linha, no tempo 4h, diferem em relação ao mesmo grupo no tempo 0h ($P < 0,05$) (Comparando tempos).



Cist = Cisteamina; 2-ME = 2-Mercaptoetanol; BSO = *DL-Buthionine Sulfoximide*

Figura 6- Porcentagem média de espermatozóides com membrana plasmática íntegra, acrossomo lesado e com potencial mitocondrial (ILC) durante fecundação em meio suplementado com antioxidantes (Cisteamina - Cist ou 2-Mercaptoetanol - 2-ME) ou com um inibidor da síntese de glutatona (DL-Buthionine Sulfoximide - BSO), na ausência ou presença de heparina, nos tempos 0 hora e 4 horas após o início da FIV.

Tabela 6- Porcentagem média de espermatozoides com membrana plasmática íntegra, acrossomo lesado e sem potencial mitocondrial (ILS) durante a fecundação *in vitro* em meio contendo ou não antioxidantes, na presença ou ausência de heparina.

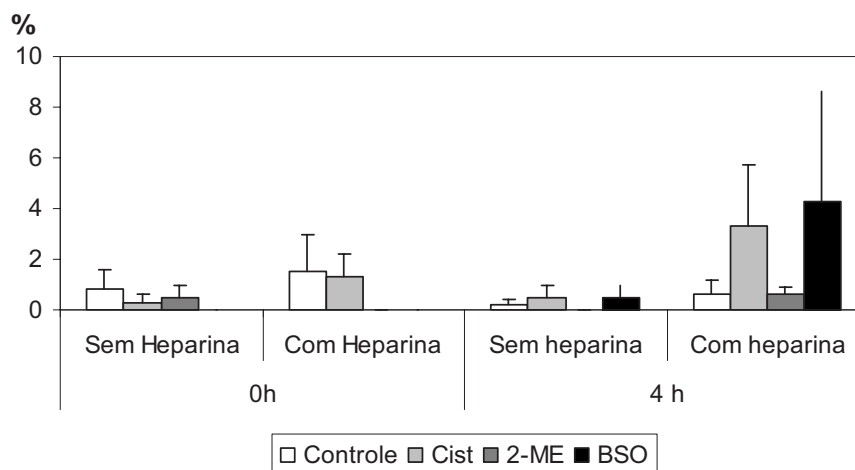
Grupo	ILS (Média ± EPM)			
	0 h		4 h	
	Sem heparina	Com heparina	Sem heparina	Com heparina
Controle	0,8 ± 0,8	1,5 ± 1,5	0,2 ± 0,2	0,6 ± 0,6
Cist.	0,3 ± 0,3	1,3 ± 0,9	0,5 ± 0,5	3,3 ± 2,4
2-ME	0,5 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,6 ± 0,3
BSO	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,5	4,3 ± 4,3

Cist = Cisteamina; 2-ME = 2-Mercaptoetanol; BSO = *DL-Buthionine Sulfoximide*

^{ab} Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$) (Comparando grupos).

^{AB} Letras maiúsculas diferentes na mesma linha, para cada grupo, dentro do mesmo tempo, diferem entre si ($p < 0,05$) (Comparando presença ou ausência de heparina).

* Médias seguidas de asterisco, na linha, no tempo 4h, diferem em relação ao mesmo grupo no tempo 0h ($P < 0,05$) (Comparando tempos).



Cist = Cisteamina; 2-ME = 2-Mercaptoetanol; BSO = *DL-Buthionine Sulfoximide*

Figura 7- Representação gráfica da porcentagem média de espermatozoides com membrana plasmática íntegra, acrossomo lesado e sem potencial mitocondrial (ILS) durante fecundação em meio suplementado com antioxidantes (Cisteamina - Cist ou 2-Mercaptoetanol - 2-ME) ou com um inibidor da síntese de glutatona (*DL-Buthionine Sulfoximine* - BSO), na ausência ou presença de heparina, nos tempos 0 hora e 4 horas após o início da FIV.

As porcentagens de espermatozoides com membrana plasmática lesada, acrossomo íntegro e com função mitocondrial (LIC) estão representadas na Tabela 7 e Figura 8. Não houve diferenças entre os grupos (Controle, Cist, 2-ME e BSO), entre os tempos 0 e 4 horas e também entre os tratamentos (sem e com heparina). Os dados não forneceram resultados estatísticos. Numericamente, houve um aumento do padrão (LIC) nos grupos Cist e BSO durante o tempo (4h, com heparina), mas verificou-se uma diminuição desse padrão nesse mesmo tempo e tratamento para o grupo Controle.

As porcentagens de espermatozoides com membrana plasmática lesada, acrossomo íntegro e sem função mitocondrial (LIS) estão representadas na Tabela 8 e Figura 9. Entre os grupos (Contr, Cist, 2-ME e BSO) não houve uma diferença significativa ($P > 0,05$) dentro de cada momento (0h ou 4h) e também na presença ou ausência de heparina no meio de fecundação. No momento 4 horas, no grupo com heparina, foi observado aumento significativo ($P < 0,05$) de espermatozoides classificados como LIS tanto em relação ao mesmo grupo no momento 0 hora quanto no grupo sem heparina no tempo 4 horas. Os dados demonstram que houve um aumento no número de espermatozoides com membrana acrossomal íntegra durante o tempo, porém, ocorreu também um maior número de espermatozoides que apresentaram tanto membrana plasmática lesada quanto baixo potencial mitocondrial.

Tabela 7- Porcentagem média de espermatozoides com membrana plasmática lesada, acrossomo íntegro e com potencial mitocondrial (LIC) durante a fecundação *in vitro* em meio contendo ou não antioxidantes, na presença ou ausência de heparina.

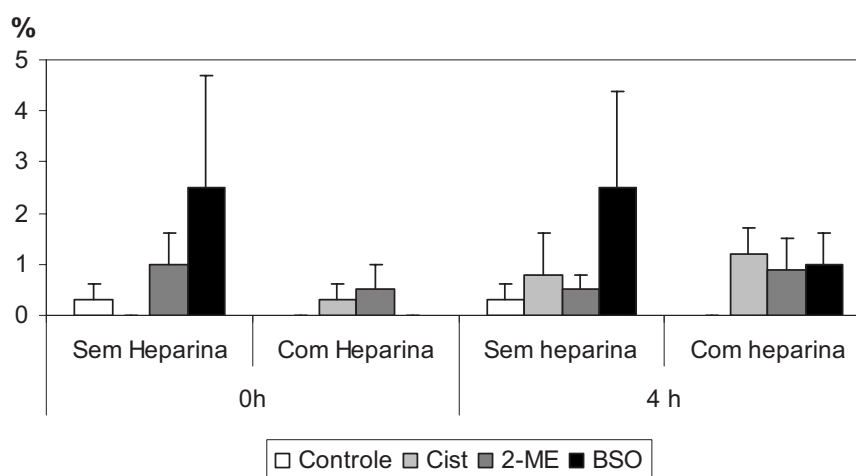
Grupo	LIC (Média ± EPM)			
	0 h		4 h	
	Sem heparina	Com heparina	Sem heparina	Com heparina
Controle	0,3 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,3	0,0 ± 0,0
Cist.	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,3	0,8 ± 0,8	1,2 ± 0,5
2-ME	1,0 ± 0,6	0,5 ± 0,5	0,5 ± 0,3	0,9 ± 0,6
BSO	2,5 ± 2,2	0,0 ± 0,0	2,5 ± 1,9	1,0 ± 0,6

Cist = Cisteamina; 2-ME = 2-Mercaptoetanol; BSO = *DL-Buthionine Sulfoximide*

^{ab} Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$) (Comparando grupos).

^{AB} Letras maiúsculas diferentes na mesma linha, para cada grupo, dentro do mesmo tempo, diferem entre si ($p < 0,05$) (Comparando presença ou ausência de heparina).

* Médias seguidas de asterisco, na linha, no tempo 4h, diferem em relação ao mesmo grupo no tempo 0h ($P < 0,05$) (Comparando tempos).



Cist = Cisteamina; 2-ME = 2-Mercaptoetanol; BSO = *DL-Buthionine Sulfoximide*

Figura 8- Representação gráfica da porcentagem média de espermatozoides com membrana plasmática lesada, acrossomo íntegro e com potencial mitocondrial (LIC) durante fecundação em meio suplementado com antioxidantes (Cisteamina - Cist ou 2-Mercaptoetanol - 2-ME) ou com um inibidor da síntese de glutatona (*DL-Buthionine Sulfoximide* - BSO), na ausência ou presença de heparina, nos tempos 0 hora e 4 horas após o início da FIV.

Tabela 8- Porcentagem média de espermatozoides com membrana plasmática lesada, acrossomo íntegro e sem potencial mitocondrial (LIS) durante a fecundação *in vitro* em meio contendo ou não antioxidantes, na presença ou ausência de heparina.

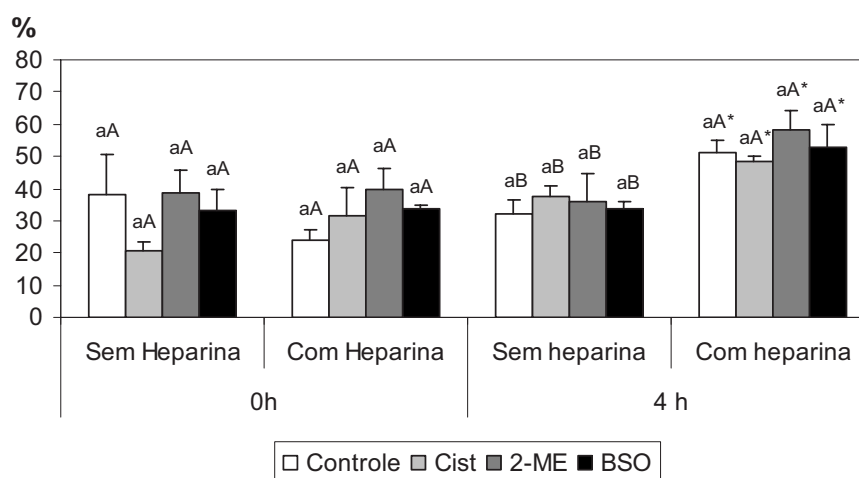
Grupo	LIS (Média ± EPM)			
	0 h		4 h	
	Sem heparina	Com heparina	Sem heparina	Com heparina
Controle	38,0 ± 12,5 ^{aA}	23,9 ± 3,4 ^{aA}	32,0 ± 4,5 ^{aB}	51,1 ± 3,6 ^{aA*}
Cist.	20,8 ± 2,5 ^{aA}	31,8 ± 8,3 ^{aA}	37,5 ± 3,2 ^{aB}	48,2 ± 2,0 ^{aA*}
2-ME	38,4 ± 7,3 ^{aA}	39,7 ± 6,7 ^{aA}	35,8 ± 9,0 ^{aB}	58,2 ± 6,1 ^{aA*}
BSO	33,0 ± 6,8 ^{aA}	33,5 ± 1,2 ^{aA}	33,9 ± 1,9 ^{aB}	52,9 ± 6,7 ^{aA*}

Cist = Cisteamina; 2-ME = 2-Mercaptoetanol; BSO = *DL-Buthionine Sulfoximide*

^{ab} Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,05) (Comparando grupos).

^{AB} Letras maiúsculas diferentes na mesma linha, para cada grupo, dentro do mesmo tempo, diferem entre si (p<0,05) (Comparando presença ou ausência de heparina).

* Médias seguidas de asterisco, na linha, no tempo 4h, diferem em relação ao mesmo grupo no tempo 0h (P < 0,05) (Comparando tempos).



Cist = Cisteamina; 2-ME = 2-Mercaptoetanol; BSO = *DL-Buthionine Sulfoximide*

Figura 9- Representação gráfica da porcentagem média de espermatozoides com membrana plasmática lesada, acrossomo íntegro e sem potencial mitocôndrial (LIS) durante fecundação em meio suplementado com antioxidantes (Cisteamina - Cist ou 2-Mercaptoetanol - 2-ME) ou com um inibidor da síntese de glutatona (*DL-Buthionine Sulfoximine* - BSO), na ausência ou presença de heparina, nos tempos 0 hora e 4 horas após o início da FIV.

As porcentagens de espermatozoides com membrana plasmática lesada, acrossomo íntegro e sem função mitocondrial (LLC) estão representadas na Tabela 9 e Figura 10. Os dados não forneceram resultados estatísticos, porém, numericamente houve um pequeno aumento desse tipo de padrão (LLC) após 4 horas de fecundação nos grupos Controle e Cist. Nos grupos 2-ME e BSO esse tipo de padrão não se preservou.

As porcentagens de espermatozoides com membrana plasmática lesada, acrossomo íntegro e sem função mitocôndrial (LLC) estão representadas na Tabela 10 e Figura 11. Não houve um efeito significativo ($P > 0,05$) entre os grupos (Controle, Cist, 2-ME e BSO). No tempo 0 hora, a comparação dos grupos sem e com heparina demonstrou diferença significativa ($P < 0,05$). Houve um aumento significativo ($P < 0,05$) de espermatozoides na categoria LLS no grupo 4 horas sem heparina em relação ao mesmo grupo no tempo 0 hora. Os resultados demonstram que houve uma tendência de aumentar esse padrão (LLS) durante o tempo, sem a presença de heparina no meio TALP-FIV.

Tabela 9- Porcentagem média de espermatozoides com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e com potencial mitocondrial (LLC) durante a fecundação *in vitro* em meio contendo ou não antioxidantes, na presença ou ausência de heparina.

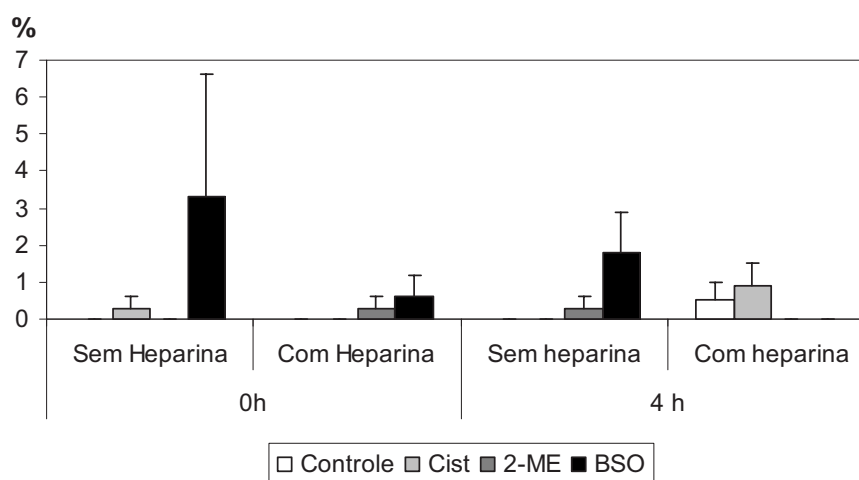
Grupo	LLC (Média ± EPM)			
	0 h		4 h	
	Sem heparina	Com heparina	Sem heparina	Com heparina
Controle	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,5
Cist.	0,3 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,9 ± 0,6
2-ME	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,3	0,3 ± 0,3	0,0 ± 0,0
BSO	3,3 ± 3,3	0,6 ± 0,6	1,8 ± 1,1	0,0 ± 0,0

Cist = Cisteamina; 2-ME = 2-Mercaptoetanol; BSO = *DL-Buthionine Sulfoximide*

^{ab} Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$) (Comparando grupos).

^{AB} Letras maiúsculas diferentes na mesma linha, para cada grupo, dentro do mesmo tempo, diferem entre si ($p < 0,05$) (Comparando presença ou ausência de heparina).

* Médias seguidas de asterisco, na linha, no tempo 4h, diferem em relação ao mesmo grupo no tempo 0h ($P < 0,05$) (Comparando tempos).



Cist = Cisteamina; 2-ME = 2-Mercaptoetanol; BSO = *DL-Buthionine Sulfoximide*

Figura 10- Representação gráfica da porcentagem média de espermatozoides com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e com potencial mitocondrial (LLC) durante fecundação em meio suplementado com antioxidantes (Cisteamina - Cist ou 2-Mercaptoetanol - 2-ME) ou com um inibidor da síntese de glutathione (*DL-Buthionine Sulfoximine* - BSO), na ausência ou presença de heparina, nos tempos 0 hora e 4 horas após o início da FIV.

Tabela 10- Porcentagem média de espermatozoides com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e sem potencial mitocondrial (LLS) durante a fecundação *in vitro* em meio contendo ou não antioxidantes, na presença ou ausência de heparina.

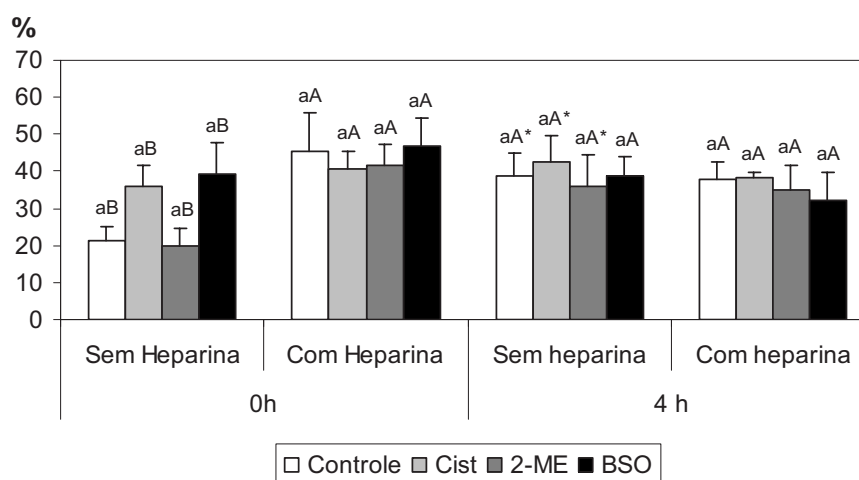
Grupo	LLS (Média ± EPM)			
	0 h		4 h	
	Sem heparina	Com heparina	Sem heparina	Com heparina
Controle	21,5 ± 3,8 ^{aB}	45,6 ± 10,1 ^{aA}	38,9 ± 6,1 ^{aA*}	37,8 ± 4,7 ^{aA}
Cist.	35,8 ± 5,7 ^{aB}	40,8 ± 4,7 ^{aA}	42,8 ± 6,9 ^{aA*}	38,3 ± 1,6 ^{aA}
2-ME	19,9 ± 4,8 ^{aB}	41,8 ± 5,3 ^{aA}	36,1 ± 8,5 ^{aA*}	35,0 ± 6,4 ^{aA}
BSO	39,3 ± 8,3 ^{aB}	46,9 ± 7,6 ^{aA}	39,0 ± 5,1 ^{aA}	32,2 ± 7,4 ^{aA}

Cist = Cisteamina; 2-ME = 2-Mercaptoetanol; BSO = *DL-Buthionine Sulfoximide*

^{ab} Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,05) (Comparando grupos).

^{AB} Letras maiúsculas diferentes na mesma linha, para cada grupo, dentro do mesmo tempo, diferem entre si (p<0,05) (Comparando presença ou ausência de heparina).

* Médias seguidas de asterisco, na linha, no tempo 4h, diferem em relação ao mesmo grupo no tempo 0h (P < 0,05) (Comparando tempos).



Cist = Cisteamina; 2-ME = 2-Mercaptoetanol; BSO = *DL-Buthionine Sulfoximide*

Figura 11- Representação gráfica da porcentagem média de espermatozoides com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e sem potencial mitocondrial (LLS) durante fecundação em meio suplementado com antioxidantes (Cisteamina - Cist ou 2-Mercaptoetanol - 2-ME) ou com um inibidor da síntese de glutathione (*DL-Buthionine Sulfoximine* - BSO), na ausência ou presença de heparina, nos tempos 0 hora e 4 horas após o início da FIV.

As porcentagens de espermatozoides com membrana plasmática íntegra estão representadas na Tabela 11 e Figura 12. Não foi observado efeito significativo ($P > 0,05$) entre os grupos (Controle, Cist, 2-ME e BSO). No entanto, entre os grupos na ausência ou presença de heparina dentro de cada momento (0h ou 4h) foi constatada uma diferença significativa ($P < 0,05$). Quando foi feita a comparação do efeito do tempo (0 hora e 4 horas), observou-se significativa ($P < 0,05$) diminuição da porcentagem de espermatozoides com a membrana plasmática íntegra, tanto nos grupos sem heparina como nos grupos com heparina. Os dados demonstram uma queda nas médias de espermatozoides que preservaram a integridade de membrana plasmática durante o tempo.

As porcentagens de espermatozoides com acrossomo íntegro, estão representadas na Tabela 12 e Figura 13. Não foi constatado um efeito significativo ($P > 0,05$) entre os grupos (Controle, Cist, 2-ME e BSO). Porém, foi observada diferença significativa ($P < 0,05$) no tempo 0 horas entre os grupos sem e com heparina, exceto para o BSO. O antioxidante 2-ME apresentou dados significativamente ($P < 0,05$) menores no tempo 4 horas no grupo sem heparina em relação ao mesmo grupo no tempo 0 horas. Os espermatozoides mantiveram o acrossomo íntegro durante o tempo, no entanto, esse padrão não foi influenciado pela presença de antioxidantes (Cist e 2-ME) no meio TALP-FIV.

Tabela 11- Porcentagem média de espermatozoides com membrana plasmática intacta durante a fecundação *in vitro* em meio contendo ou não antioxidantes, na presença ou ausência de heparina.

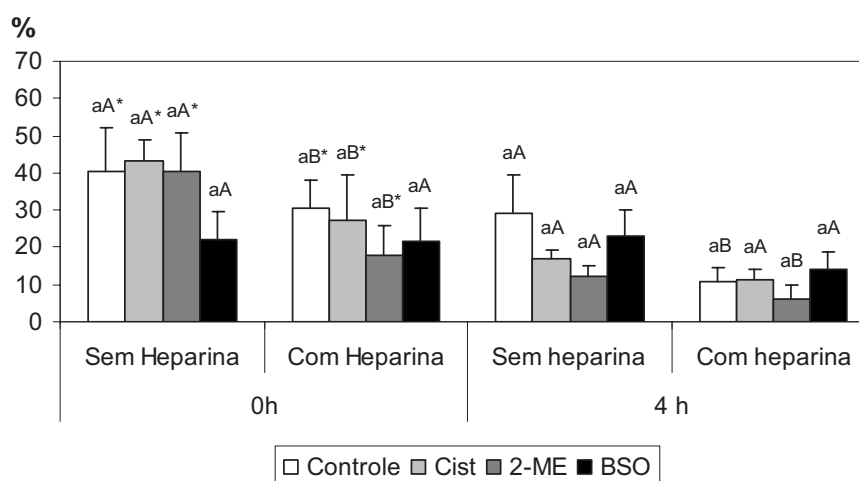
Grupo	Membrana plasmática (Média ± EPM)			
	0 h		4 h	
	Sem heparina	Com heparina	Sem heparina	Com heparina
Controle	40,3 ± 12,0 ^{aA*}	30,4 ± 7,5 ^{aB*}	28,9 ± 10,7 ^{aA}	10,6 ± 4,1 ^{aB}
Cist.	43,3 ± 5,6 ^{aA*}	27,3 ± 12,1 ^{aB*}	17,0 ± 2,3 ^{aA}	11,5 ± 2,5 ^{aA}
2-ME	40,5 ± 10,3 ^{aA*}	17,8 ± 8,1 ^{aB*}	12,4 ± 2,7 ^{aA}	5,9 ± 3,9 ^{aB}
BSO	21,9 ± 7,7 ^{aA}	21,5 ± 8,9 ^{aA}	23,1 ± 7,0 ^{aA}	13,9 ± 4,8 ^{aA}

Cist = Cisteamina; 2-ME = 2-Mercaptoetanol; BSO = *DL-Buthionine Sulfoximide*

^{ab} Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,05) (Comparando grupos).

^{AB} Letras maiúsculas diferentes na mesma linha, para cada grupo, dentro do mesmo tempo, diferem entre si (p<0,05) (Comparando presença ou ausência de heparina).

* Médias seguidas de asterisco, na linha, no tempo 4h, diferem em relação ao mesmo grupo no tempo 0h (P < 0,05) (Comparando tempos).



Cist = Cisteamina; 2-ME = 2-Mercaptoetanol; BSO = *DL-Buthionine Sulfoximide*

Figura 12- Representação gráfica da porcentagem média de espermatozoides com membrana plasmática íntegra durante fecundação em meio suplementado com antioxidantes (Cisteamina - Cist ou 2-Mercaptoetanol - 2-ME) ou com um inibidor da síntese de glutathione (*DL-Buthionine Sulfoximide* - BSO), na ausência ou presença de heparina, nos tempos 0 hora e 4 horas após o início da FIV.

Tabela 12- Porcentagem média de espermatozoides acrossoma intacto durante a fecundação *in vitro* em meio contendo ou não antioxidantes, na presença ou ausência de heparina.

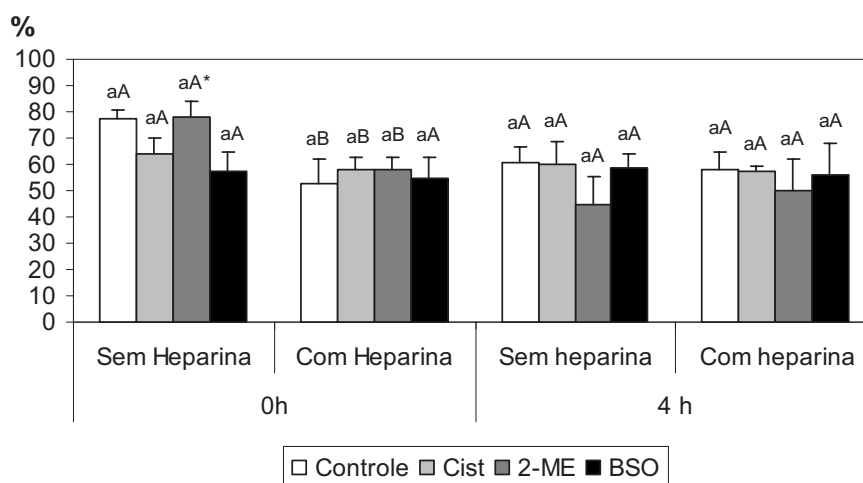
Grupo	Acrossomo (Média ± EPM)			
	0 h		4 h	
	Sem heparina	Com heparina	Sem heparina	Com heparina
Controle	77,3 ± 3,5 ^{aA}	52,4 ± 9,4 ^{aB}	60,9 ± 6,0 ^{aA}	58,3 ± 6,4 ^{aA}
Cist.	63,8 ± 6,0 ^{aA}	58,0 ± 4,5 ^{aB}	59,8 ± 8,8 ^{aA}	57,6 ± 1,7 ^{aA}
2-ME	78,1 ± 5,8 ^{aA*}	57,7 ± 5,1 ^{aB}	44,9 ± 10,4 ^{aA}	49,8 ± 12,3 ^{aA}
BSO	57,4 ± 7,1 ^{aA}	54,5 ± 8,2 ^{aA}	59,0 ± 5,1 ^{aA}	56,0 ± 12,1 ^{aA}

Cist = Cisteamina; 2-ME = 2-Mercaptoetanol; BSO = *DL-Buthionine Sulfoximide*

^{ab} Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,05) (Comparando grupos).

^{AB} Letras maiúsculas diferentes na mesma linha, para cada grupo, dentro do mesmo tempo, diferem entre si (p<0,05) (Comparando presença ou ausência de heparina).

* Médias seguidas de asterisco, na linha, no tempo 4h, diferem em relação ao mesmo grupo no tempo 0h (P < 0,05) (Comparando tempos).



Cist = Cisteamina; 2-ME = 2-Mercaptoetanol; BSO = *DL-Buthionine Sulfoximide*

Figura 13- Representação gráfica da porcentagem média de espermatozoides com acrossoma intacto durante fecundação em meio suplementado com antioxidantes (Cisteamina - Cist ou 2-Mercaptoetanol - 2-ME) ou com um inibidor da síntese de glutatona (*DL-Buthionine Sulfoximide* - BSO), na ausência ou presença de heparina, nos tempos 0 hora e 4 horas após o início da FIV.

As porcentagens de espermatozoides com alto potencial mitocondrial estão representadas na Tabela 13 e Figura 14. Não foi observado efeito significativo ($P>0,05$) entre os grupos (Controle, Cist, 2-ME e BSO). Verificou-se que as médias diminuíram significativamente ($P<0,05$) dentro de cada tempo (0h e 4h) entre o grupo com heparina em relação ao grupo sem heparina. O antioxidante 2-ME apresentou uma média menor ($P<0,05$) no momento 4 horas na ausência de heparina em relação ao mesmo grupo no momento 0 hora. Não houve efeito dos antioxidantes em preservar a função mitocondrial, bem como esta função também não se manteve durante o tempo.

Tabela 13- Porcentagem média de espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial durante a fecundação *in vitro* em meio contendo ou não antioxidantes, na presença ou ausência de heparina.

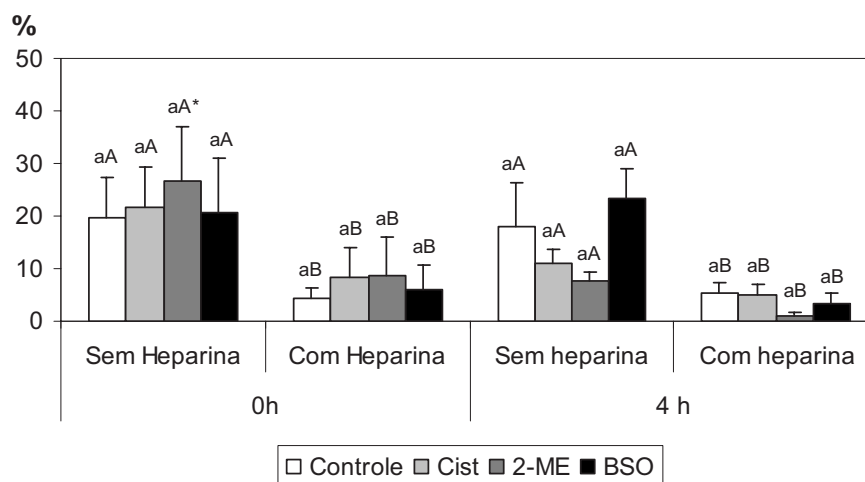
Grupo	Mitocôndria (Média \pm EPM)			
	0 h		4 h	
	Sem heparina	Com heparina	Sem heparina	Com heparina
Controle	19,8 \pm 7,4 ^{aA}	4,5 \pm 1,9 ^{aB}	18,1 \pm 8,1 ^{aA}	5,2 \pm 2,3 ^{aB}
Cist.	21,8 \pm 7,6 ^{aA}	8,5 \pm 5,4 ^{aB}	11,0 \pm 2,6 ^{aA}	5,0 \pm 2,1 ^{aB}
2-ME	26,7 \pm 10,3 ^{aA*}	8,7 \pm 7,4 ^{aB}	7,8 \pm 1,7 ^{aA}	1,1 \pm 0,7 ^{aB}
BSO	20,7 \pm 10,4 ^{aA}	5,9 \pm 4,7 ^{aB}	23,5 \pm 5,4 ^{aA}	3,5 \pm 2,0 ^{aB}

Cist = Cisteamina; 2-ME = 2-Mercaptoetanol; BSO = *DL-Buthionine Sulfoximide*

^{ab} Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si ($P<0,05$) (Comparando grupos).

^{AB} Letras maiúsculas diferentes na mesma linha, para cada grupo, dentro do mesmo tempo, diferem entre si ($p<0,05$) (Comparando presença ou ausência de heparina).

* Médias seguidas de asterisco, na linha, no tempo 4h, diferem em relação ao mesmo grupo no tempo 0h ($P < 0,05$) (Comparando tempos).



Cist = Cisteamina; 2-ME = 2-Mercaptoetanol; BSO = *DL-Buthionine Sulfoximide*

Figura 14- Representação gráfica da porcentagem média de espermatozoides com alto potencial mitocondrial durante fecundação em meio suplementado com antioxidantes (Cisteamina - Cist ou 2-Mercaptoetanol - 2-ME) ou com um inibidor da síntese de glutathione (*DL-Buthionine Sulfoximine* - BSO), na ausência ou presença de heparina, nos tempos 0 hora e 4 horas após o início da FIV.

3.2 Experimento 2 – Avaliação da Integridade da Cromatina

A média da integridade da cromatina dos espermatozoides está representada na Tabela 14 e o padrão de coloração para análise do DNA espermático está ilustrado na Figura 15. Não foram constatadas diferenças entre as médias sobre a integridade da cromatina dos espermatozoides entre os grupos (Controle, Cist, 2-ME e BSO), entre os tempos (0 e 4 horas) e também entre os grupos sem e com heparina. Sendo assim, os resultados não necessitaram ser analisados estatisticamente. Os espermatozoides bovinos quase na sua totalidade apresentaram o DNA íntegro entre os diferentes tratamentos e durante o tempo no processo de fecundação.

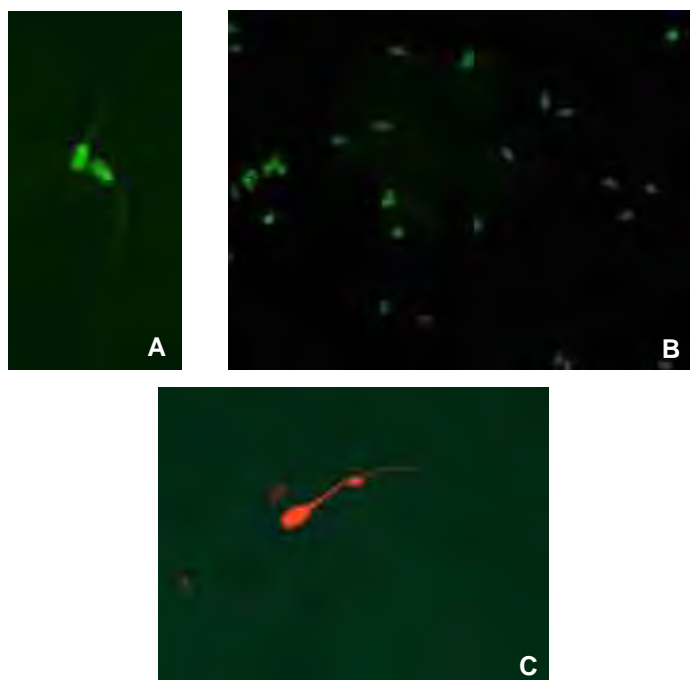


Figura 15- Fotomicrografia de epifluorescência das células espermáticas coradas com “Acridine Orange” (A O). **A.e B.** Espermatozóides normais com cromatina íntegra (fluorescência verde). **C.** Espermatozóide anormal com cromatina lesada (cor vermelha). Imagens digitalizadas.

Tabela 14- Porcentagem média de espermatozóides com cromatina íntegra durante a fecundação *in vitro* em meio suplementado com antioxidantes (Cisteamina - Cist ou β -Mercaptoetanol - 2-ME) ou com um inibidor da síntese de glutatona (DL-Buthionine Sulfoximine - BSO), na ausência ou presença de heparina, nos tempos 0 hora e 4 horas após o início da FIV.

Grupo	Integridade da cromatina (Média)			
	0 h		4 h	
	Sem heparina	Com heparina	Sem heparina	Com heparina
Controle	100,0	100,0	99,3	93,0
Cist.	99,7	99,7	99,2	99,8
2-ME	100,0	100,0	100,0	100,0
BSO	100,0	100,0	100,0	100,0

4 DISCUSSÃO

Neste experimento verificou-se os efeitos, nos espermatozóides bovinos, da suplementação de antioxidantes (cisteamina e 2-ME) no meio de fecundação e da presença ou ausência de heparina nesse meio. Verificou-se ainda a influência do tempo (0 e 4 horas após FIV) sobre a viabilidade espermática na FIV. Avaliou-se a integridade das membranas espermáticas (plasmática e acrossomal) e potencial mitocondrial pela associação das sondas fluorescentes (PI, FITC-PSA e JC-1) (Exp. 1). Verificou-se também a integridade da cromatina por fluorocromo (AO) (Exp. 2).

No Exp.1, não foi observado efeito dos antioxidantes na preservação da membrana plasmática, acrossomal e função mitocondrial. A presença de heparina no meio TAL-FIV não afetou a viabilidade da célula espermática. Os espermatozóides não mantiveram os padrões de membrana plasmática íntegra e potencial mitocondrial durante o tempo, no entanto, a célula espermática foi capaz de preservar o acrossomo íntegro durante o tempo.

No Exp. 2, a integridade do DNA do espermatozóide não foi influenciado pela adição de antioxidantes e heparina ao meio TALP-FIV, como também pela ação do tempo.

O citoplasma das células somáticas contém vários antioxidantes (catalase, GSH e SOD). Porém, devido ao tamanho reduzido, o citoplasma da célula espermática possui pequenas concentrações desses antioxidantes, tornado os espermatozóides susceptíveis à ação das ROS (FOOTE et al., 2002). O sêmen utilizado para programas de FIV, em humanos, ou inseminação artificial em animais domésticos, é exposto ao oxigênio e a luz durante vários momentos do processo (FOOTE et al., 2002). Esse estresse oxidativo pode provocar um impacto na integridade do genoma (AITKEN et al., 1998) bem com a peroxidação lipídica das membranas das células espermáticas (STOREY, 1997). No espermatozóide, a produção de ROS está associada à perda da motilidade

e o decréscimo da capacidade de interação com o oócito (AITKEN et al., 1994). O processo de criopreservação reduz as concentrações de antioxidantes no sêmen (BILODEAU et al., 2000). Segundo Medina et al., (2000), a baixa fertilidade do sêmen descongelado na espécie ovina é atribuída, em grande parte, às alterações por que passam as membranas espermáticas (plasmática, acrossomal e mitocondriais), com as evidências de que as ROS podem provocar danos ao DNA e membranas da célula espermática. Foote et al. (2002) sugeriram que para melhorar a sobrevivência e fertilidade dos espermatozoides criopreservado de bovinos o tratamento do sêmen com a combinação de vários antioxidantes. No entanto, em nosso estudo, a adição de antioxidantes ao meio de fecundação não preservou a motilidade e a integridade das membranas espermáticas durante o tempo. De acordo com Tartaglione e Ritta (2004), a criopreservação promove danos irreversíveis na morfologia, alteração do influxo de cálcio e mudanças na atividade enzimática da membrana plasmática e acrossomal. Segundo Celeghini (2005), a porcentagem de membrana plasmática lesada devido a criopreservação foi de 59,9% e 49,23% dependendo do diluidor utilizado. Valcárcel et al. (1994) observaram uma queda de 70% na integridade da membrana plasmática dos espermatozoides de carneiros, após a criopreservação do sêmen, mantendo-se apenas 15% das membranas intactas. Vários eventos durante a fecundação como capacitação espermática, reação acrossomal e interação entre os gametas requerem uma membrana funcional e intacta (TARTAGLIONE; RITTA 2004). Salmon e Maxwell (1995) relataram que a célula espermática pode estar móvel, mas estar danificada, de tal maneira que a penetração e fecundação do oócito seja prejudicada. Entretanto, em trabalho recente de Fatehi et al. (2005) descreveram que a irradiação provocou danos ao DNA da célula espermática, porém, não afetou a morfologia, motilidade e integridade da membrana plasmática dos espermatozoides e que estes foram capazes de fertilizar o oócito desenvolvendo normalmente até os estádios 2 a 4 células, aparentemente

depois da formação de pró-núcleos e singamia de dois pro-núcleos haplóides. Em nosso experimento, a centrifugação do sêmen pode ter contribuído para a perda da integridade das membranas espermáticas, pois, segundo Dode et al. (2002) esse procedimento causa danos ao espermatozóide gerando ROS e peroxidação das membranas espermáticas.

Avaliar simultaneamente a integridade das membranas espermáticas aumenta a acurácia da análise do sêmen, pois fornece maior número de dados na amostra, da porcentagem de espermatozóides com capacidade para fertilizar o oócito (CELEGHINI, 2005). Gillan et al., (2005) descreveram o importante uso das sondas fluorescentes para a avaliação de diferentes estruturas da célula espermática e sua relação com a capacidade fertilizante do sêmen. Para a avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal associação das sondas PI e FITC-PSA vem sendo utilizada para espermatozóides de carneiros (SUKARDI et al., 1997), humanos (CENTOLA et al., 1990), eqüinos (ARRUDA, 2000; ARRUDA et al., 2003) e bovinos (GRAHAM et al., 1990). Para avaliar a função mitocondrial, o PI, também foi associado com sondas como R123 (rodamina 123), MITO (mito tracker green) e JC-1e foram observados correlações positivas dessas sondas com a motilidade (GARNER et al., 1997). Para a leitura das amostras, as técnicas de avaliação das diferentes estruturas espermáticas pelas sondas fluorescentes devem ser validadas por análise de microscopia de epifluorescência, antes de serem aplicadas ao sistema de citometria de fluxo (CELEGHINI, 2005). O citômetro de fluxo é um aparelho de alto custo e não permite a visualização do padrão da coloração das células. No entanto, a avaliação por microscopia verifica como o corante preenche cada célula e a intensidade de fluorescência emitida pela sonda (CELEGHINI, 2005).

Celeghini (2005) relatou resultados satisfatórios sobre o estado das membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial pela associação das sondas fluorescentes. Harrison e Vickers (1990) verificaram que amostras

de sêmen de cachacos durante a preparação no processo da FIV indicaram considerável aumento nas porcentagens de células com a membrana plasmática e acrossomo lesado. Nesse mesmo estudo, eles coraram as células com PI e diacetato de carboxifluoresceína, e então, reportaram que todas as células se tornaram rapidamente permeáveis aos corantes depois de passarem por algum tipo de estresse.

Para Celeghini (2005) os percentuais de acrossomos danificados pela criopreservação, indicados pela sonda FITC-PSA, foram de 30,82 e 17,25% dependendo do diluidor utilizado. Nossos dados mostraram taxas de elevadas de acrossomo íntegro, sendo este padrão preservado durante o processo de fecundação *in vitro*. Ikeda et al., (2002) relataram que a integridade do acrossomo teve um efeito significativo sobre as taxas de FIV em relação à motilidade espermática. Em outro estudo, Anilkumar et al. (2001), usando amostras de sêmen congelado de bovinos, descreveram correlação entre parâmetros espermáticos e a distância de penetração no gel de poliacrilamida. Esses autores observaram que os espermatozóides com maior capacidade em penetrar o gel foram aqueles que apresentaram acrossomo íntegro. Os dados de nosso experimento sugerem que esse padrão pode ter contribuído para interação entre espermatozóide-oócito.

A integridade da função mitocondrial em nosso experimento foi o padrão que mais sofreu a ação de fatores estressantes durante o processo da FIV. Os espermatozóides não mantiveram o potencial mitocondrial durante o tempo e também não foram influenciados pelo efeito protetor dos antioxidantes. Porém, Celeghini (2005) observou que o processo de congelação afeta a função mitocondrial, entretanto, obteve uma média de 16,96 e 23,96%, dependendo do diluidor, de espermatozóides com alto potencial mitocondrial, este avaliado pelo JC-1. Contudo, Thomas et al., (1998) notaram apenas 0,9% dos espermatozóides com fluorescência laranja-avermelhada após a congelação. Estes autores, também verificaram que este procedimento aumenta as células com membrana plasmática

lesada, coradas por PI, e que a intensidade da fluorescência emitida pelo PI e JC-1 diminuiu após a criopreservação.

Segundo nosso experimento, a cromatina dos espermatozoides bovinos se mostrou quase 100% íntegra durante todo o processo de FIV. Não sofreu ação do tempo, do estresse promovido pelos procedimentos e possível efeito das ROS. No entanto, Anzar et al. (2002), relataram que a criopreservação do sêmen bovino causa fragmentação nos espermatozoides e apoptose espermática. Contudo, Dutty et al. (2002) observaram que a criopreservação do sêmen humano não afeta a integridade da cromatina, mesmo em congelação rápida sem crioprotetor, indicando a congelação uma forma de conservar amostra de sêmen para submetê-la à análise do DNA pelo ensaio cometa.

Bochenek et al. (2001), encontraram uma variação de 2,1 a 23% de células com DNA desnaturado, enquanto, que Januskauskas et al. (2003), relataram média de $2,6 \pm 1,55\%$ em espermatozoides bovinos.

Os antioxidantes, cisteamina e 2-ME e a presença de heparina ao meio TALP-FIV, não promoveram efeitos sobre a integridade das membranas espermáticas afetadas durante o processo fecundação *in vitro*. A cromatina espermática, também não sofreu influência dos antioxidantes, como da heparina, porém, esta estrutura se mostrou mais resistente aos fatores estressantes e ao longo do tempo na FIV.

5 CONCLUSÃO

- A suplementação do meio de fecundação com antioxidantes (cisteamina e 2-mercaptoetanol) não influenciou a integridade da membrana plasmática, do acrossoma e o potencial mitocondrial.
- Os espermatozoides não preservaram a integridade da membrana plasmática e função da mitocôndria durante o tempo e na presença de heparina no meio de fecundação.
- A integridade do acrossoma se manteve nos diferentes tratamentos e durante o tempo no processo de fecundação *in vitro*.
- A cromatina espermática mostrou alta integridade durante todo o processo de fecundação, não sofrendo influência dos antioxidantes e também da ausência ou presença de heparina no meio TALP-FIV.

6 REFERÊNCIAS

- AITKEN, R.J.; GORDON, E.; HARKISS, D.; TWIGG, J.P.; MILNE, P. JENNINGS, Z.; IRVINE, D.S. Reative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 1037-1046, 1998.
- ALI, A.A.; BILODEAU, J.F.; SIRARD, M.A. Antioxidants requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. **Theriogenology**, v. 59, p. 939-949, 2003.
- ANILKUMAR, R.; DEVANATHAN, T.G.; PATTABIRAMAN, S.R; EDWIN, M.J. Correlation between the spermatozoal characteristics and sperm penetration distance in polyacrylamide gel and bovine cervical mucus. **Theriogenology**, v. 55, p. 685-691, 2001.
- ANZAR, M.; HE, L.; BUHR, M.M.; KROETSCH, T.G.; PAULS, K.P. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 354-360, 2002.
- ARRUDA, R.P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000. 121f. Tese (Livre Docência)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, 2000.
- ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C. Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides bovinos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 17, 2003, Beberibe, CE. **Anais...** Beberibe, CE: Acta Scientiae Veterinariae, v. 31, Suplemento, p. 230-231, 2003.
- BAVISTER, B.D. A consistently successful procedure for *in vitro* fertilization of Golden Hamster eggs. **Gamete Research**, v.23, p.139-158, 1989.
- BILODEAU, J.F.; CHATTERJEE, S.; SIZARD, M.A. Cryopreservation of bovine semen decreases antioxidant defenses in spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 60, n. 1, p. 102, 1999. Abstract .
- BILODEAU, J.F.; CHATTERJEE, S.; SIZARD, M.A.; GAGNON, C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, p. 282-288, 2000.

BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; GAGNON, C.; SIZARD, M.A. Thiols prevent H₂O₂- Mediated loss sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, v. 58, p. 275-288, 2001.

BOCHENEK, M.; SMORAG, Z.; PILCH, J. Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination. **Theriogenology**, v. 56, p. 557-567, 2001.

CELEGHINI, E.C.C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina utilizando sondas fluorescentes**. 2005 190f., Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; RAPHAEL, C.F.; NASCIMENTO, J. Simultaneous evaluation of the plasmatic, acrosomal and mitochondrial membranes in equine spermatozoa. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL. 15., 2004. Porto Seguro, BA. **Proceedings...** Porto Seguro, BA, p. 511, 2004.

CENTOLA, G.M.; MATTOX, J.H.; BURDE, S.; LEARY, J.F. Assessment of the viability and acrosome status of fresh and frozen-thawed human spermatozoa using single-wavelength fluorescence microscopy. **Molecular Reproduction and Development**, v 27, n. 2, p. 130-135, 1990.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C.A. Reactive oxygen species and human spermatozoa. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. **Journal of Andrology**, v. 13, p. 368-378, 1993.

EVENSON, D.P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M.R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. **Science**, v. 210, p. 1131-1133, 1980.

FATEHI, A.N.; BEVERS, M.M.; SCHOEVERS, E.; ROELEN, B.A.J.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B.M. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization an early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 6, 2005.

FOOTE, R. H.; BROCKETT, C.C.; KAPROTH, M.T. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v.71, p. 13-23, 2002.

FURUYA, S.; ENDO, Y.; OSUMI, K.; OBA, M.; SUZUKI, S. Effects of modulators of protein kinase C on human sperm capacitation. **Fertility and Sterility**, v. 59, p. 1285-1290, 1993.

GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; JOERG, H.W.; DEJARNETTE, J.M.; MARSHALL, C.E. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1401-1406, 1997.

GRAHAM, J.K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 55-64, 1990.

HARRISON, R.A.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p. 343-0352, 1990.

HSU, P.C.; HSU, C.C.; GUO, Y.L. Hydrogen peroxide induces premature acrosome reaction in rat sperm and reduces their penetration of the zone pellucida. **Toxicology**, v. 139, p. 93-101, 1999.

IGNOTZ, G.G., LO, M.C., PEREZ, C.L., GWATHMEY, T.M., SUAREZ, S.S. Characterization of a fucose-binding protein from bull sperm and seminal plasma that may be responsible for formation of the oviductal sperm reservoir. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1806-1811, 2001.

IKEDA, H.; KIKUCHI, K.; NOGUCHI, J.; TAKEDA, H.; SHIMADA, A.; MIZOKAMI, T. Effect of preincubation of cryopreserved porcine epididymal sperm. **Theriogenology**, v.57, p. 1309-1318, 2002.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. **Theriogenology**, v. 60, p. 743-758, 2003.

LANGLAIS, J.; KAN, F.W.K.; GRANGER, I.; RAYMOND, L.; BLEAU, G.; ROBERTS, K.D. Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa during *in vitro* capacitation. **Gamete Research**, v. 20, p. 185-201, 1988.

LITTLELL, R.C.; MILLIKEN, G.A.; STROUP, W.W.; WOLFINGER, R.D. **SAS system for mixed models**. Cary, NC, USA: SAS: Institute Inc., 1996, 633p.

LUVONI, G.C.; KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B.G. Improvement of bovine embryo production *in vitro* by glutathione-containing medium. **Molecular Reproduction and Development**, v. 43, p. 437-443, 1996.

MEDINA, V.H.; VICENTE, W.R.R.; ESPER, C.R.; MALHEIROS, E.B. Uso de sondas fluorescentes para a avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozoides ovinos antes e após a congelação. **Ars Veterinária**, v. 16, n. 3, p. 204-209, 2000.

O'FLAHERTY, C.; PECONI, M.; BIORLEGUI, N. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. **Andrology**, v. 29, p. 269-275, 1997.

O'FLAHERTY, C.M.; BEORLEGUI, N.B.; BECONI, M.T. Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. **Theriogenology**, v. 52, p. 289-301, 1999.

SINGH, J.P.; BABCOCK, D.F.; LARDY, H.A. Increased calcium-ion influx is a component of capacitation of spermatozoa. **Biochemical Journal**, v. 172, p. 549-556, 1978.

STOREY, B.T. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**. V.3, p. 203-214, 1997.

SUKARDI, S.; CURRY, M.R.; WATSON, P.F. Simultaneous detection of the acrosomal status and viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. **Reproduction Science**, v. 46, p. 89-96, 1997.

ROLDAN, E.R.S.; HARRISON, R.A.P. Molecular mechanisms leading to exocytosis during the sperm acrosome reaction. In: BAVISTER, B.B. CUMMING, J., ROLDAN, E.R.S. (EDS). **Fertilization in mammals**. p. 179-196, Norwell, MA: Sereno Symposia, 1990.

TARTAGLIONE, C.M.; RITTA, M.N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors *in vitro* fertility of frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 62, p. 1245-1252, 2004.

TEJADA, R.I.; MITCHELL, J.C.; NORMAN, A.; MARIK, J.J.; FRIEDMAN, S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. **Fertility and Sterility**, v.42, n.1, p.87-91, 1984.

THOMAS, C.A.; GARNER, D.L.; DEJARNETTE, J.M.; MARSHALL, C.E. Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in Cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 991-998, 1997.

TOSIC, J. Mechanism of hydrogen peroxide formation by spermatozoa and the role of amino-acids in sperm motility. **Nature**, v. 159, p. 544, 1947.

UNANIAN, M.M. **Integridade da cromatina: método complementar para avaliação da qualidade do sêmen bovino**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000 21p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 56).

WHITE , D.R.; AITKEN, R.J. Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. **Gamete Research**, v. 22, p. 163-177, 1989.

WOLF, A. **Estímulo da síntese de glutationa na maturação *in vitro* de oócitos bovinos e sua influência no desenvolvimento embrionário.** 2005 101f., Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005

YANAGIMACHI, R.; USUI, N. Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. **Experimental Cell Research**, v. 89, p. 161-174, 1974.