

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITOS DA BIOESTIMULAÇÃO A LASER NAS
TAXAS DE MATURAÇÃO, FERTILIZAÇÃO E CULTIVO DE
EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO***

Rubia Bueno da Silva

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia

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

**JABOTICABAL – SÃO PAULO
Maio de 2008**

Silva, Rubia Bueno
S586e Efeitos da bioestimulação a laser nas taxas de maturação,
fertilização e cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro* / Rubia
Bueno da Silva. -- Jaboticabal, 2008
xx, 149 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008

Orientador: Joaquim Mansano Garcia

Banca examinadora: Gisele Zoccal Mingoti, Nivaldo Antonio
Parizotto

Bibliografia

1.Embrião. 2.Laser. 3.Bovino. 4.*In vitro*. Título. II. Jaboticabal-
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.646:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

unesp



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



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: EFEITOS DA BIOESTIMULAÇÃO A LASER NAS TAXAS DE MATU
RAÇÃO, FERTILIZAÇÃO E CULTIVO DE EMBRIÕES BOVINOS
PRODUZIDOS *IN VITRO*

AUTORA: RUBIA BUENO DA SILVA

ORIENTADOR: Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA

Co-Orientador(a): Dr. CESAR ROBERTO ESPER

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em MEDICINA
VETERINÁRIA área de REPRODUÇÃO ANIMAL pela Comissão Examinadora:

Dr. CESAR ROBERTO ESPER

Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI

Dr. NIVALDO ANTONIO PARIZOTTO

Data da realização: 30 de abril de 2008.

Presidente da Comissão Examinadora

Dr. CESAR ROBERTO ESPER

Co-Orientador no exercício da orientação

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RUBIA BUENO DA SILVA – nascida em Osasco – SP, aos 21 dias do mês de fevereiro de 1980, concluiu o ensino médio na Escola de Primeiro e Segundo Grau “Embaixador Assis Chateaubriand”, na cidade de Osasco – SP, em dezembro de 1997; ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA, Câmpus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista - UNESP, em fevereiro de 1999; obteve bolsa de iniciação científica da FAPESP, junto ao Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, de abril a dezembro de 2001; concluiu, em dezembro de 2003, o curso superior em Medicina Veterinária; ingressou, em fevereiro de 2004, no programa de residência em Reprodução Animal, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA, Câmpus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista – UNESP, obtendo sua conclusão em fevereiro de 2006; ingressou em março de 2006, o curso de Mestrado, no Programa de Medicina Veterinária, Área de Concentração Reprodução Animal, na FCAV – UNESP de Jaboticabal, com bolsa de Mestrado da FAPESP.

AGRADECIMENTOS

Sem a colaboração e incentivo de algumas pessoas e empresas, este trabalho não poderia ter sido realizado...

A Deus, sempre em primeiro lugar na minha vida, pelas bênçãos infindáveis e por me indicar a direção. “Este é o caminho, andai por ele.”

À minha família, por me dar sempre o amor e incentivo que preciso para viver, por me proporcionarem os melhores momentos da minha vida, e por servirem de exemplo diariamente em minha caminhada.

Ao meu namorado Lorivaldo Paz Landim Junior, por todos os momentos de alegria ou tristeza ao longo destes anos, pelo apoio e amor incondicionais, e por ter permitido que este trabalho fosse realizado a quatro mãos.

Aos meus grandes amigos de longa data: Adélio Gurgel do Amaral Júnior, Alexandre Redson Soares da Silva, Dorival Antônio Cavalheiro Jacomassi, Fernanda Dunder dos Santos, Guillermo Carlos Veiga de Oliveira, Lígia Garcia Mesquita, Rodrigo Norberto Pereira, Rodrigo Vitório Alonso, Taiana Pereira da Costa, Thiago André Carreo Costa.

À Aline Costa de Lúcio, por se revelar uma grande amiga, me auxiliando em tudo o que foi preciso, espero retribuí-la em breve!

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias por abrir-me as portas deste câmpus e ter permitido a realização do mestrado.

À “velha guarda” do laboratório de Reprodução Animal, com quem eu tive o prazer de conviver nas primeiras vezes em que estagiei e por serem exemplos na minha vida acadêmica: Alexandre Wolf, Christina Ramires Ferreira, Eliana Cristina Gasoto, Felipe Perecin, Gabriel Ferreira Soria, Lorivaldo Paz Landim Junior, Max Vitória Resende, Sandra Helena Gabaldi, Simone Cristina Méo Niciura, Walt Yamazaki.

Aos “novos amigos” do laboratório pelo convívio, amizade e auxílio fundamentais em diferentes fases de execução deste trabalho: Aline Costa de

Lúcio, Ana Paula Perini, Clara Slade Oliveira, Danilas Salinet de Melo, Eliandra Antonia Pires, Juliana Corrêa Borges, Mabel Freitas Cordeiro, Marcelo Barbosa Bezerra, Maria Emília Franco Oliveira, Michelly Fernandes de Macedo, Naiara Zoccal Saraiva, Roberta Machado Ferreira, Tatiane Almeida Drummond Tetzner.

Aos professores Francisco Guilherme Leite e Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima, pelo incentivo, convívio e colaboração mesmo que indireta neste trabalho, e especialmente aos professores Cesar Roberto Esper e Paulo Henrique Franceschini, pelas considerações muito pertinentes no exame geral de qualificação.

Ao professor Flávio Vieira Meirelles pela colaboração na metodologia de trabalho e ao professor Júlio Cesar de Carvalho Balieiro, pela disposição e auxílio ímpares, desde o primeiro momento que lhe foi solicitado até o estágio final da dissertação.

Ao professor Nivaldo Antonio Parizotto pela contribuição fundamental, desde a compra do equipamento de laser até a elaboração final da dissertação, sempre pronto a ajudar.

À professora Gisele Zoccal Mingoti pela acolhida em seu laboratório, pela atenção fundamental que me foi dada durante todos os dias em frente ao microscópio e pelas considerações durante a defesa. Também agradeço à Fernanda Patrícia Gottardi pela colaboração durante esse período, me auxiliando no que foi necessário.

Às doutoras Christina Ramires Ferreira e Simone Cristina Méo Niciura, e ao doutorando Marcos Roberto Chiaratti por dividirem seus conhecimentos, pelas orientações sempre muito bem-vindas e pelo fornecimento de material científico.

Aos funcionários do Departamento Ivo Luís de Almeida Júnior, Isabel Aparecida Penariol Natarelli, Roberta Vantini, Paulo Sérgio, pelo auxílio, sempre.

À FAPESP pela concessão da bolsa de estudos.

Aos frigoríficos Bertin (Lins – SP) e Marfrig (Promissão – SP) pelo fornecimento de grande parte do material biológico utilizado nos experimentos.

Aos animais, meu respeito e eterna gratidão.

Em especial, ao meu orientador Joaquim Mansano Garcia, por ter acreditado no meu trabalho e na capacidade de desenvolvê-lo, apoiando-me e oferecendo-me as condições necessárias para sua realização.

APOIO FINANCEIRO

Esse projeto foi financiado pela **Fundação de Amparo à Pesquisa de Estado de São Paulo – FAPESP** sob processo nº 05/58240-0, no período de março de 2006 a fevereiro de 2008.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
EFEITOS DA BIOESTIMULAÇÃO A LASER SOBRE AS TAXAS DE MATURAÇÃO, FERTILIZAÇÃO E CULTIVO DE EMBRIÕES PRODUZIDOS <i>IN VITRO</i>	xvii
BIOSTIMULATION EFFECTS OF LASER ON <i>IN VITRO</i> MATURATION, FERTILIZATION AND CULTURE RATES OF BOVINE EMBRYOS	xix
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
Introdução	1
Revisão de literatura	2
Considerações sobre o laser	10
Características físicas do laser	11
Comprimento de onda único	11
Direção, colimação e polarização	13
Padrões de irradiação	14
Potência óptica útil	14
Irradiância e fluência	14
Emissão contínua ou pulsada	15
Aplicações terapêuticas do laser	16
Histórico	16
Conceito de bioestimulação e laserterapia.	17
Bioestimulação <i>in vivo</i>	18
Bioestimulação <i>in vitro</i>	20
Mecanismos de ação do laser visível e infravermelho	23
Objetivos	25
Objetivo geral	25
Objetivos específicos	25
Efeitos sobre a MIV	25
Efeitos sobre a FIV	25
Efeitos sobre a CIV	26
REFERÊNCIAS	27
CAPÍTULO 2 – EFEITOS DA IRRADIAÇÃO COM LASERS DE BAIXA POTÊNCIA NA MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE OÓCITOS BOVINOS	43
Resumo	43
Introdução	44
Revisão de literatura	45
Oogênese e maturação nuclear	45
Maturação citoplasmática	46
Laser de baixa potência sobre os diferentes aspectos da maturação oocitária	47
Mitocôndrias e fosforilação oxidativa	47

Geração de Espécies Reativas do Oxigênio (EROs)	50
Apoptose	52
Cálcio	54
Material e métodos	55
Obtenção e maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos	55
Equipamento de laser	55
Experimento I – Efeitos da irradiação de oócitos com laser infravermelho (780 nm) e visível (660 nm) na maturação nuclear e citoplasmática	56
Coloração de cromatina	56
Coloração de grânulos corticais	57
Experimento II – Efeitos da irradiação de oócitos com laser infravermelho (780 nm) e visível (660 nm) na produção de blastocistos	58
Análise estatística	59
Resultados	59
Experimento I - Efeitos da irradiação de oócitos com laser infravermelho (780 nm) e visível (660 nm) na maturação nuclear e citoplasmática	59
Coloração de cromatina	59
Coloração de grânulos corticais	61
Experimento II – Efeitos da irradiação de oócitos com laser infravermelho (780 nm) e visível (660 nm) na produção de blastocistos	63
Discussão	64
Experimento I - Efeitos da irradiação de oócitos com laser infravermelho (780 nm) e visível (660 nm) na maturação nuclear e citoplasmática	64
Experimento II – Efeitos da irradiação de oócitos com laser infravermelho (780 nm) e visível (660 nm) na produção de blastocistos	68
Conclusões	70
REFERÊNCIAS	71
CAPÍTULO 3 – EFEITOS DA IRRADIAÇÃO COM LASERS DE BAIXA POTÊNCIA NA FERTILIZAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE OÓCITOS BOVINOS	78
Resumo	78
Introdução e revisão de literatura	79
Capacitação espermática e reação acrossomal	79
Laser de baixa potência sobre os diferentes aspectos da fertilização	81
Concentrações de íons cálcio	81
Fosforilação protéica	83
Geração de Espécies Reativas do Oxigênio (EROs)	85
Material e métodos	86
Obtenção e maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos	86
Fertilização <i>in vitro</i> de oócitos bovinos	86
Equipamento de laser	87
Experimento III - Efeitos da irradiação de espermatozóides com laser infravermelho (780 nm) e visível (660 nm) sobre a clivagem, produção e cinética no desenvolvimento de blastocistos	87
Análise estatística	88

Resultados	89
Discussão	95
Experimento III - Efeitos da irradiação de espermatozóides com laser infravermelho (780 nm) e visível (660 nm) sobre a clivagem, produção e cinética no desenvolvimento de blastocistos	95
Conclusões	100
REFERÊNCIAS	102
CAPÍTULO 4 – EFEITOS DA IRRADIAÇÃO COM LASERS DE BAIXA POTÊNCIA NO CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS	111
Resumo	111
Introdução	112
Revisão de literatura	114
Necessidades metabólicas	114
Fosforilação oxidativa e glicólise	114
Espécies Reativas do Oxigênio (EROs)	116
Transcrição	117
Material e métodos	118
Obtenção e maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos	118
Fertilização <i>in vitro</i> de oócitos bovinos	119
Cultivo <i>in vitro</i> de oócitos bovinos	119
Equipamento de laser	119
Experimento IV: Efeitos da irradiação de embriões com laser infravermelho (780 nm) e visível (660 nm) na produção e cinética do desenvolvimento de blastocistos	119
Experimento V: Efeitos da irradiação de embriões com laser infravermelho (780 nm) e visível (660 nm) na qualidade dos blastocistos	120
Análise estatística	121
Resultados	122
Experimento IV: Efeitos da irradiação de embriões com laser infravermelho (780 nm) e visível (660 nm) na produção e cinética do desenvolvimento de blastocistos	122
Experimento V: Efeitos da irradiação de embriões com laser infravermelho (780 nm) e visível (660 nm) na qualidade dos blastocistos	126
Discussão	128
Experimento IV: Efeitos da irradiação de embriões com laser infravermelho (780 nm) e visível (660 nm) na produção e cinética do desenvolvimento de blastocistos	128
Experimento V: Efeitos da irradiação de embriões com laser infravermelho (780 nm) e visível (660 nm) na qualidade dos blastocistos	131
Conclusões	133
REFERÊNCIAS	135
APÊNDICES	142

LISTA DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO 2 – EFEITOS DA IRRADIAÇÃO COM LASERS DE BAIXA POTÊNCIA NA MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE OÓCITOS BOVINOS	43
Tabela 1. Porcentagem de oócitos bovinos com maturação nuclear após 24 horas de cultivo <i>in vitro</i>	60
Tabela 2. Porcentagem de oócitos bovinos com grânulos corticais localizados à periferia após 24 horas de maturação <i>in vitro</i>	61
Tabela 3. Porcentagem de produção de embriões ao sétimo dia de cultivo, em relação ao total de oócitos destinados à maturação <i>in vitro</i>	63
CAPÍTULO 3 – EFEITOS DA IRRADIAÇÃO COM LASERS DE BAIXA POTÊNCIA NA FERTILIZAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE OÓCITOS BOVINOS	78
Tabela 4. Porcentagem de estruturas clivadas <i>in vitro</i> com 72 hpf, em relação ao total de oócitos bovinos destinados à maturação	89
Tabela 5. Porcentagem de embriões produzidos <i>in vitro</i> ao sétimo dia de cultivo, em relação ao total de oócitos destinados à maturação	91
Tabela 6. Porcentagem de blastocistos iniciais produzidos <i>in vitro</i> ao sétimo dia de cultivo, em relação ao total de oócitos destinados à maturação	92
Tabela 7. Porcentagem de blastocistos produzidos <i>in vitro</i> ao sétimo dia de cultivo, em relação ao total de oócitos destinados à maturação	92
Tabela 8. Porcentagem de blastocistos expandidos produzidos <i>in vitro</i> ao sétimo dia de cultivo, em relação ao total de oócitos destinados à maturação	93
Tabela 9. Porcentagem de blastocistos eclodidos produzidos <i>in vitro</i> ao sétimo dia de cultivo, em relação ao total de oócitos destinados à maturação	93
CAPÍTULO 4 – EFEITOS DA IRRADIAÇÃO COM LASERS DE BAIXA POTÊNCIA NO CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS	111
Tabela 10. Porcentagem de embriões produzidos <i>in vitro</i> ao sétimo dia de cultivo, em relação ao total de oócitos maturados	122
Tabela 11. Porcentagem de blastocistos iniciais produzidos <i>in vitro</i> ao D7, em relação ao total de oócitos destinados à maturação	123
Tabela 12. Porcentagem de blastocistos produzidos <i>in vitro</i> ao D7, em relação ao total de oócitos destinados à maturação	124
Tabela 13. Porcentagem de blastocistos expandidos produzidos <i>in vitro</i> ao D7, em relação ao total de oócitos destinados à maturação	124

Tabela 14. Porcentagem de blastocistos eclodidos produzidos <i>in vitro</i> ao D7, em relação ao total de oócitos destinados à maturação	124
Tabela 15. Número total de células embrionárias em blastocistos produzidos <i>in vitro</i> ao sétimo dia de cultivo	127
APÊNDICE B - ESPECIFICAÇÕES TÉCNICAS DO EQUIPAMENTO DE LASER E PARÂMETROS DE IRRADIAÇÃO	145
Tabela 1B. Especificações técnicas do equipamento de laser Twin Laser (MM Optics® LTDA, São Carlos, São Paulo, Brasil) e padrões de irradiação utilizados nos experimentos	146

LISTA DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O LASER	43
Figura 1. Esquema representativo de um equipamento de laser com seus componentes: meio amplificador, tubo de ressonância, espelhos refletor, feixe de laser. (adaptado de PÉCORA & BRUGNERA JÚNIOR, 1999)	10
Figura 2. Esquema representativo do espectro eletromagnético com suas diferentes regiões e comprimentos de onda (Princeton University [On line], disponível em < http://web.princeton.edu/sites/ehs/laserguide/index.htm >, 2007)	12
Figura 3. Esquema representativo dos mecanismos de ação do laser operando na região do visível e do infravermelho próximo (adaptado de ALMEIDA-LOPES, 2003)	24
CAPÍTULO 2 – EFEITOS DA IRRADIAÇÃO COM LASERS DE BAIXA POTÊNCIA NA MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE OÓCITOS BOVINOS	43
Figura 4. Esquema representativo do processo de OXPHOS. O transporte de elétrons consiste de quatro complexos enzimáticos dispostos na membrana mitocondrial interna, e a passagem por estes, libera energia na forma de gradiente de prótons, utilizada pelo complexo V chamado de ATP sintetase para produzir ATP. No complexo I ocorre a desidrogenação do NADH e transporte de elétrons para a coenzima Q. O transporte de elétrons é acoplado com o deslocamento de prótons para a membrana mitocondrial interna. O complexo II cataliza a oxidação do succinato para fumarato, durante o transporte de elétrons de FADH ₂ para o reservatório de ubiquinona; complexo III catalisa a transferência de elétrons do ubiquinol para citocromo c acoplado ao deslocamento de prótons para a membrana mitocondrial interna. O complexo IV está acoplado com a transferência de elétrons da redução do citocromo c para o oxigênio, levando a um deslocamento de prótons pela membrana mitocondrial interna, criando um gradiente utilizado para a síntese de ATP no complexo V. (adaptado de MESQUITA, 2005)	49
Figura 5. Oócito bovino evidenciando maturação nuclear após 24 horas de incubação <i>in vitro</i> , corado com 10g/mL de Hoechst 33342 durante 10 minutos e observado sob microscopia óptica epifluorescente. (MII) Metáfase II e (CP) corpúsculo polar presente no espaço perivitelínico (núcleo maturo)	57
Figura 6. Distribuição dos grânulos corticais (GC) em oócitos bovinos maturados <i>in vitro</i> por 24 horas e observados sob microscópio óptico epifluorescente. (a) GC localizados na periferia	

do ooplasma (citoplasma maturo); (b) GC em transição do centro para a periferia (citoplasma imaturo); (c) GC concentrados em “clusters” (citoplasma imaturo). Coloração com 10 g/mL de <i>Lens culinaris</i> (específica à α -D-manose) conjugada a FITC por 15 minutos	58
Figura 7. Porcentagem de oócitos bovinos com maturação nuclear após 24 horas de cultivo <i>in vitro</i>	60
Figura 8. Porcentagem de oócitos bovinos com GC localizados à periferia após 24 horas de maturação <i>in vitro</i>	62
Figura 9. Porcentagem de produção de embriões no D7, em relação ao total de oócitos destinados à maturação <i>in vitro</i>	63
CAPÍTULO 3 – EFEITOS DA IRRADIAÇÃO COM LASERS DE BAIXA POTÊNCIA NA FERTILIZAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE OÓCITOS BOVINOS	78
Figura 10. Porcentagem de estruturas clivadas <i>in vitro</i> com 72 hpf, em relação ao total de oócitos bovinos destinados à maturação	90
Figura 11. Porcentagem de embriões produzidos <i>in vitro</i> ao sétimo dia de cultivo, em relação ao total de oócitos destinados à maturação	91
Figura 12. Porcentagem de embriões bovinos produzidos ao sétimo dia de cultivo <i>in vitro</i> e avaliados quanto à cinética de desenvolvimento. Becl – blastocisto eclodido; Bx – blastocisto expandido; Bl – blastocisto; Bi – blastocisto inicial	94
CAPÍTULO 4 – EFEITOS DA IRRADIAÇÃO COM LASERS DE BAIXA POTÊNCIA NO CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS	111
Figura 13. Blastocisto bovino ao 7º dia de cultivo <i>in vitro</i> corados com 10g/mL de Hoechst 33342 durante 10 minutos, observados sob luz epifluorescente	121
Figura 14. Porcentagem de embriões produzidos <i>in vitro</i> ao sétimo dia de cultivo, em relação ao total de oócitos destinados à maturação	122
Figura 15. Porcentagem de embriões bovinos produzidos ao sétimo dia de cultivo <i>in vitro</i> e avaliados quanto à cinética de desenvolvimento. Becl – blastocisto eclodido; Bx – blastocisto expandido; Bl – blastocisto; Bi – blastocisto inicial	125
Figura 16. Número de células embrionárias em blastocistos produzidos ao sétimo dia de cultivo <i>in vitro</i>	127
APÊNDICE A - OBTENÇÃO E MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE OÓCITOS BOVINOS	143
Figura 1A. Classificação dos complexos cumulus-oócitos de bovinos de acordo com sua morfologia, sob microscópio estereoscópico. (a) grau I; (b) grau II; (c) grau III; (d) atrésico e (e) desnudo	144
APÊNDICE B - ESPECIFICAÇÕES TÉCNICAS DO EQUIPAMENTO DE LASER E PARÂMETROS DE IRRADIAÇÃO ..	145

- Figura 1B.** Equipamento de Laser Twin Laser (MM Optics® LTDA, São Carlos, São Paulo, Brasil) utilizado nos experimentos. (a) painel frontal com visor indicando potência, tempo, dosagem e tipo de caneta; botões para seleção de funções e ajuste de parâmetros. (b) suporte em teflon adaptado com caneta emissora de laser infravermelho acoplada 145
- Figura 2B.** Método de aplicação do laser adotado nos experimentos. (a) haste para fixação da platina aquecedora. (b) platina aquecedora. (c) placa de cultivo contendo estruturas a serem irradiadas. (d) suporte em teflon adaptado com caneta emissora de laser acoplada 147

LISTA DE ABREVIATURAS

λ	Comprimento de onda
μg	Micro grama
μL	Micro litro
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celcius
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	Concentração de cálcio intracelular
AC.....	Adenil ciclase
ADP.....	Adenosina difosfato
AIF.....	Fator indutor de apoptose
AKAP.....	Proteína ancoradora de quinase - A
AMP.....	Monofosfato de adenosina
AMPc.....	AMP cíclico
AsGa.....	Arseneto de gálio
AsGaAl.....	Arseneto de gálio e alumínio
ATP.....	Adenosina trifosfato
ATPase (ou ATPsintetase).....	Adenosina trifosfatase
Bax.....	"Bcl-2- associated X protein"
Bcl-2.....	"B cell leukemia/lymphoma 2"
Becl.....	Blastocisto eclodido
Bi.....	Blastocisto inicial
Bl.....	Blastocisto
BSA.....	Albumina sérica bovina
Bx.....	Blastocisto expandido
Ca^{2+} -ATPase.....	ATPase transportadora de íons cálcio
Ca^{2+}	Íons cálcio
CIV.....	Cultivo <i>in vitro</i>
Cl^-	Íons cloro
cm^2	Centímetro quadrado
CO_2	Gás carbônico
COC.....	Complexo <i>cumulus</i> -oócito
CP.....	Corpúsculo polar
Cx43.....	Conexina 43
DNA.....	Ácido desoxirribonucléico
DNA NAP1L1.....	Conjunto de proteínas-1 semelhante ao nucleossomo-1
DNase.....	Desoxirribonuclease
ERO.....	Espécie reativa do oxigênio
EST.....	"Expressed sequence tag"
FADH.....	Dinucleotídeo de flavina
FD.....	Fatores decapacitantes
FITC-LCA.....	Isotiocianato de fluoresceína <i>Lens culinaris</i>

FIV.....	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH.....	Hormônio folículo estimulante
GC.....	Grânulos corticais
GV.....	Vesícula germinativa
H ⁺	Íons hidrogênio
hCG.....	Gonadotrofina coriônica humana
HCO ₃ ⁻	Íons bicarbonato de sódio
H ₂ O.....	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
He-Ne.....	Hélio e neônio
Hz.....	Hertz
hpf.....	Horas pós-fertilização
InsP ₃	“Inositol 1,4,5-triphosphate”
J.....	Joules
K ⁺	Íons potássio
K ⁺ -ATPase.....	ATPase transportadora de íons potássio
LASER.....	Amplificação de Luz por Emissão Estimulada de Radiação
LH.....	Hormônio luteinizante
LLLT.....	Terapia laser de baixa intensidade
MAPK.....	Proteína quinase ativada por mitógeno
MCP.....	Morte celular programada
MII.....	Metáfase II
min.....	Minuto
MIV.....	Maturação <i>in vitro</i>
mm.....	Milímetro
mm ²	Milímetro quadrado
mM.....	Mili molar
mL.....	Mili litro
MMI.....	Membrana mitocondrial interna
MP.....	Membrana plasmática
m/v.....	Massa sobre volume
mW.....	Milli Watts
Na ⁺	Íons sódio
NAD.....	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH.....	Forma reduzida da NAD
NADP.....	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH.....	Forma reduzida da NADP
NAP1L1.....	Conjunto de Proteínas-1 semelhante ao Nucleossomo-1
NFLC.....	Fator Nuclear semelhante à citocina
nm.....	Nanômetros
O ₂ ⁻	Radical ânion superóxido
O ₂	Oxigênio
OH ⁻	Radical hidroxila

OXPHOS.....	Fosforilação oxidativa
P.....	Fosfato
PBS.....	Solução salina em tampão fosfato
PIV.....	Produção <i>in vitro</i>
PKA.....	Proteína quinase A
PSCD2.....	“Pleckstrin homology, sec7 and coiled-coil domains 2”
PVA.....	Álcool polivinílico
PVP.....	Polivinilpirrolidona
RA.....	Reação acrossomal
RNA.....	Ácido ribonucléico
RNAm.....	RNA mensageiro
seg.....	Segundos
SB.....	Solução de bloqueio
SFB.....	Soro Fetal Bovino
SOD.....	Superóxido dismutase
SOF.....	Fluido sintético do oviduto
TALP-HEPES.....	“Tyrode’s Albumin Lactate and Pyruvate” com HEPES
TCM.....	“Tissue culture medium”
v/v.....	Volume sobre volume
ZP.....	Zona pelúcida
W.....	Watts

EFEITOS DA BIOESTIMULAÇÃO A LASER SOBRE AS TAXAS DE MATURAÇÃO, FERTILIZAÇÃO E CULTIVO DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO*.

RESUMO – Foram investigados os efeitos da irradiação com diodos lasers operando em 780 nm (infravermelho) e 660 nm (visível) na maturação, fertilização e cultivo *in vitro* de embriões bovinos. Verificou-se que a irradiação de oócitos com ambos os lasers, durante 30, 60, 120 e 180 segundos (L30, L60, L120, L180) não afetou ($p>0,05$) as taxas de maturação nuclear (Infravermelho: L30 - 88,92% vs. C30 - 81,84%; L60 - 83,56% vs. C60 - 87,40%; L120 - 76,06% vs. C120 - 85,30%; L180 - 77,42% vs. C180 - 80,16%; e Visível: L30 - 65,81% vs. C30 - 71,59%; L60 - 62,75% vs. C60 - 69,62%; L120 - 70,38% vs. C120 - 64,04%; L180 - 56,72% vs. C180 - 67,41%), e de maturação citoplasmática, avaliada por meio da distribuição dos grânulos corticais (Infravermelho: L30 - 86,18% vs. C30 - 61,04%; L60 - 66,03% vs. C60 - 56,16%; L120 - 53,75% vs. C120 - 79,81%; L180 - 57,70% vs. C180 - 82,04% e Visível: L30 - 81,08% vs. C30 - 74,42%; L60 - 68,11% vs. C60 - 61,63%; L120 - 75,95% vs. C120 - 48,33%; L180 - 77,77% vs. C180 - 59,52%). As porcentagens de produção embrionária ao sétimo dia de cultivo *in vitro* não foram alteradas ($p>0,05$) após a irradiação de oócitos com laser infravermelho (L30 - 29,20% vs. C30 - 42,60%; L60 - 32,0% vs. C60 - 31,0%; L120 - 38,0% vs. C120 - 35,0%; L180 - 37,0% vs. C180 - 32,0%), mas foram reduzidas após a irradiação com laser visível durante 180 seg. (L180 - 36,0% vs. C180 - 56,0 %). A irradiação em espermatozoides com ambos os lasers não afetou ($p>0,05$) as taxas de clivagem ao terceiro dia de cultivo *in vitro* (Infravermelho: L30 - 90,0% vs. C30 - 95,83%; L60 - 85,56% vs. C60 - 98,33%; L120 - 90,83% vs. C120 - 90,83%; L180 - 89,72% vs. C180 - 97,50%; e Visível: L30 - 82,96% vs. C30 - 85,61%; L60 - 82,10% vs. C60 - 82,53%; L120 - 80,48% vs. C120 - 82,44%; L180 - 83,53% vs. C180 - 87,15%) e a produção de embriões ao sétimo dia de cultivo *in vitro* (Infravermelho: L30 - 49,45% vs. C30 - 57,50%;

L60 – 41,95% vs. C60 – 46,67%; L120 – 38,33% vs. C120 – 46,67%; L180 – 44,17% vs. C180 – 40,83% e Visível: L30 – 48,46% vs. C30 – 46,09%; L60 – 45,20% vs. C60 – 42,39%; L120 – 45,84% vs. C120 – 42,28%; L180 – 51,99% vs. C180 – 44,80%), bem como a cinética de desenvolvimento embrionário, avaliada por meio das porcentagens de blastocistos iniciais, blastocistos, blastocistos expandidos e blastocistos eclodidos ao sétimo dia de cultivo *in vitro*. Verificou-se que a produção embrionária não foi alterada ($p>0,05$) após a irradiação com laser infravermelho em embriões ao terceiro dia de cultivo *in vitro* (L30 – 37,33% vs. C30 – 32,84%; L60 – 28,35% vs. C60 – 29,55%; L120 – 31,36% vs. C120 – 34,26%; L180 – 24,21% vs. C180 – 33,24%), mas foi reduzida ($p<0,05$) após tratamento dos embriões com laser visível durante 30 segundos (L30 – 36,86% e C30 – 52,29%). A cinética de desenvolvimento embrionário não foi alterada ($p>0,05$) após irradiação com laser infravermelho em embriões ao sétimo dia de cultivo *in vitro*, mas foi acelerada ($p<0,05$) quando os embriões foram tratados com laser visível durante 60 segundos, verificado por meio da menor proporção de blastocistos iniciais ao sétimo dia de cultivo *in vitro* (L60 – 19,42% vs. C60 – 39,79%). A qualidade embrionária ao sétimo dia de cultivo *in vitro*, avaliada por meio do número total de células embrionárias, não foi alterada ($p>0,05$) após a irradiação de embriões ao terceiro dia de cultivo *in vitro* com ambos os lasers (Infravermelho: L30 – 75,70; L60 – 80,20; L120 – 91,58; L180 – 108,0 e C30 – 95,17; C60 – 98,40; C120 – 99,92; C180 – 79,50; e Visível: L30 – 105,08; L60 – 107,28; L120 – 91,80; L180 – 116,82 e C30 – 93,11; C60 – 97,12; C120 – 92,08; C180 – 100,08).

Palavras-Chave: Oócito, Espermatozóide, Embrião, Bovino, *In Vitro*, Laser de baixa potência.

**BIOSTIMULATION EFFECTS OF LASER ON *IN VITRO* MATURATION,
FERTILIZATION AND CULTURE RATES OF BOVINE EMBRYOS.**

ABSTRACT – The diodo lasers irradiation effects, operating in 780nm (infrared light) and 660 nm (visible light), were evaluated on *in vitro* maturation, fertilization and culture rates of bovine embryos. Both infrared and visible laser irradiation on oocytes, during 30, 60, 120 and 180 seconds (30, 60, 120, 180) did not change ($p>0,05$) the rates of nuclear maturation (Infrared: L30 – 88.92% vs. C30 – 81.84%; L60 – 83.56% vs. C60 – 87.40%; L120 – 76.06% vs. C120 – 85.30%; L180 – 77.42% vs. C180 – 80.16%; and Visible: L30 – 65.81% vs. C30 – 71.59%; L60 – 62.75% vs. C60 – 69.62%; L120 – 70.38% vs. C120 – 64.04%; L180 – 56.72% vs. C180 – 67.41%), and the cytoplasmic cortical granule distribution (Infrared: L30 – 86.18% vs. C30 – 61.04%; L60 – 66.03% vs. C60 – 56.16%; L120 – 53.75% vs. C120 – 79.81%; L180 – 57.70% vs. C180 – 82.04% and Visible: L30 – 81.08% vs. C30 – 74.42%; L60 – 68.11% vs. C60 – 61.63%; L120 – 75.95% vs. C120 – 48.33%; L180 – 77.77% vs. C180 – 59.52%). The *in vitro* embryo production rates measured on seventh day of culture were not changed ($p>0,05$) after the infrared laser irradiation (L30 – 29.20% vs. C30 – 42.60%; L60 – 32.0% vs. C60 – 31.0%; L120 – 38.0% vs. C120 – 35.0%; L180 – 37.0% vs. C180 – 32.0%), but they were reduced ($p<0,05$) after the visible laser irradiation during 180 seconds (L180 – 36.0% vs. C180 – 56.0 %). When spermatozoa were irradiated, both lasers did not change the rates of cleavage ($p>0,05$) on third day of *in vitro* culture (Infrared: L30 – 90.0% vs. C30 – 95.83%; L60 – 85.56% vs. C60 – 98.33%; L120 – 90.83% vs. C120 – 90.83%; L180 – 89.72% vs. C180 – 97.50%; and Visible: L30 – 82.96% vs. C30 – 85.61%; L60 – 82.10% vs. C60 – 82.53%; L120 – 80.48% vs. C120 – 82.44%; L180 – 83.53% vs. C180 – 87.15%), the embryo production percentages on seventh day *in vitro* culture (Infrared: L30 – 49.45% vs. C30 – 57.50%; L60 – 41.95% vs. C60 – 46.67%; L120 – 38.33% vs. C120 – 46.67%; L180 – 44.17% vs. C180 – 40.83% and Visible: L30 – 48.46% vs.

C30 – 46.09%; L60 – 45.20% vs. C60 – 42.39%; L120 – 45.84% vs. C120 – 42.28%; L180 – 51.99% vs. C180 – 44.80%) and the embryo development kinetics, determined by initial blastocyst, blastocyst, expanded blastocyst and hatched blastocyst proportions. The *in vitro* embryo production on seventh day of culture was not changed ($p>0,05$) after the infrared laser irradiation on embryos on third day *in vitro* culture (*in vitro* (L30 – 37.33% vs. C30 – 32.84%; L60 – 28.35 vs. % C60 – 29.55%; L120 – 31.36% vs. C120 – 34.26%; L180 – 24.21 vs. C180 – 33.24%), but it was reduced ($p<0,05$) after the treatment with visible laser on embryos on third day during 30 seconds (L30 – 36.86% vs. C30 – 52.29%). At the seventh day of *in vitro* culture, the kinetics of embryo development was not changed ($p>0,05$) after infrared laser irradiation on embryos on, but it was accelerated ($p<0,05$) when embryos were irradiated with visible laser during 60 seconds, verified by a lower initial blastocyst proportion (L60 – 19,42% vs. C60 – 39,79%). The embryo quality was verified at seventh day of *in vitro* culture, according to the total number of embryo cells, that wasn't changed ($p>0,05$) after irradiations with both lasers on embryos at third day of *in vitro* culture (Infrared: L30 – 75.70; L60 – 80.20; L120 – 91.58; L180 – 108.0 and C30 – 95.17; C60 – 98.40; C120 – 99.92; C180 – 79.50 and Visible: L30 – 105.08; L60 – 107.28; L120 – 91.80; L180 – 116.82 vs. C30 – 93.11; C60 – 97.12; C120 – 92.08; C180 – 100.08).

Keywords: Oocyte, Spermatozoa, Embryo, Bovine, *In Vitro*, Low intensity laser.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. Introdução

A produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos é uma biotecnologia extremamente importante tanto na pesquisa como comercialmente. Na pesquisa, atua como uma ferramenta fundamental no auxílio de outras novas biotecnologias aplicadas à reprodução animal, dentre elas, a bipartição de embriões (OZIL, 1983), a clonagem (PEIXER, 2000) e a produção de animais transgênicos (KANE, 2003). Comercialmente, esta técnica visa a maior produção de embriões bovinos, podendo ampliar o potencial reprodutor de touros de alto valor comercial, bem como de fêmeas nas suas diferentes categorias, idades, estados reprodutivos e/ou raças (FABER et al., 2003).

Atualmente, as taxas de sucesso na PIV de embriões bovinos apresentam índices de 30 a 45% a partir de oócitos maturados *in vitro*, e taxas de prenhez ao redor de 40 a 60% após a inovulação (KANE, 2003). No entanto, almeja-se a melhoria dos resultados com emprego das novas biotecnologias, elevando-se os índices reprodutivos e, conseqüentemente, econômicos. Neste contexto, a PIV como pré-requisito básico, necessita de maiores estudos em cada uma de suas etapas de execução: a Maturação *in vitro* (MIV), a Fertilização *in vitro* (FIV) e o Cultivo embrionário *in vitro* (CIV) até os estádios de mórula ou blastocisto (BARRETO, 2003), ajustando-se às diversas variáveis envolvidas no processo (LO TURCO, 2004), caso contrário, tais tecnologias tornam-se limitadas e onerosas (KANE, 2003).

Neste contexto, relatou-se satisfatoriamente o emprego do laser de baixa potência em células cultivadas *in vitro* sobre a proliferação celular, devido sua ação estimulatória nos mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos neste processo. No entanto, os efeitos dessa bioestimulação ainda são pouco conhecidos, ou mesmo descritos, principalmente na MIV, FIV e CIV de mamíferos (KREISLER et al., 2002).

Neste sentido este trabalho busca utilizar a técnica de irradiação a laser de baixa potência ao longo do processo de PIV de modo a interferir positivamente nos processos bioquímicos e moleculares envolvidos e, dessa forma, melhorar os índices na produção de embriões produzidos *in vitro*.

2. Revisão de literatura

A revisão de literatura a seguir relata os aspectos gerais do laser, de suas aplicações e de seus possíveis efeitos em modelos biológicos. Nos capítulos que seguem, as revisões abordarão de forma mais específica os assuntos propostos.

Os efeitos benéficos do laser têm sido explorados e aplicados há mais de quarenta anos, desde o seu desenvolvimento, em 1960. Especificamente na área médica, tem sido rotineiramente usado com os objetivos de diagnóstico, terapia e pesquisa (SVAASAND, 1991), tendo os campos da oftalmologia e da dermatologia, por exemplo, como as áreas que incorporaram essa tecnologia com maior frequência, verificando-se resultados excelentes e garantido-lhes ser uma técnica promissora (TORRICELLI et al., 2001).

Dentre os diversos métodos físicos utilizados na terapia e procedimentos de reabilitação, a utilização de bioestimulação em tecidos pela irradiação a laser apresenta-se como mais uma opção devido seus efeitos benéficos (NAVRATIL & DYLEVSKY, 1996), pois suas ações terapêuticas sobre diferentes tecidos biológicos são muito amplas, ao induzir efeitos trófico-regenerativos, antiinflamatórios e analgésicos, os quais têm sido demonstrados tanto em estudos *in vitro* como *in vivo*. Sua ação bioestimulatória singular é dependente de uma baixa potência e, principalmente, de características como a monocromaticidade, direcionalidade e coerência de sua luz (KUBOTA et al., 1989). Uma das aplicações mais eficientes do laser de baixa potência é na cicatrização de feridas, uma vez que o estímulo da epitelização, redução do edema e processo inflamatório, bem como do restabelecimento da micro circulação sanguínea e linfática das injúrias, leva a uma melhor nutrição e oxigenação do tecido, devido

aos efeitos regulatórios e estimulatórios do laser sobre o metabolismo celular, comprovados em diversos estudos (ALMEIDA-LOPES, 1999). Além de seus efeitos bioestimulatórios, a irradiação a laser pode ser clinicamente utilizada com efeito térmico, determinando a volatilização ou a coagulação de lesões (ex. laser argônio), bem como a secção de tecidos (ex: laser CO2) (PORTER, 1998b).

Em modelos *in vitro*, uma grande variedade de efeitos bioestimulatórios tem sido relatada a partir do uso do laser de baixa potência, principalmente na proliferação de fibroblastos (BEDNARSKA et al., 1998; KREISLER et al., 2002; PEREIRA et al., 2002; ABERGEL et al., 1987), condrócitos (SCHULTZ et al., 1985) células epiteliais (ALMEIDA-LOPES, 1999), linfócitos (IONUE et al., 1989), bem como na síntese de colágeno e pró-colágeno (ABERGEL et al., 1987; BALBONI et al., 1986; ALMEIDA-LOPES, 1999) e regeneração nervosa (ANDERS et al., 1993). Experimentos utilizando cultivo de células ósseas sob irradiação a laser de baixa potência também têm sido utilizados para entendimento dos mecanismos de sua ação no tecido ósseo, principalmente na aceleração do processo de regeneração (OZAWA et al., 1998).

As reações bioquímicas induzidas pela irradiação com laser de baixa potência ainda são pouco conhecidas, mas sabe-se que elas estão envolvidas, por exemplo, com os mecanismos da respiração celular. Uma das hipóteses é de que a bioestimulação pela luz infravermelha ative a cadeia respiratória (VAN BREUGEL & BAR, 1992; LUBART et al., 1992) fazendo com que incrementos de ATP mitocondrial sejam produzidos, favorecendo as reações da cadeia respiratória que interferem no metabolismo celular (PASSARELA et al., 1984; POURREAU-SCHNEIDER et al., 1989; FRIEDMANN et al., 1991). Com a absorção da irradiação, ativa-se o transporte de elétrons na cadeia respiratória e a ocorrência do processo de oxidação, levando a mudanças no estado redox tanto da mitocôndria, quanto do citoplasma, o que pode afetar a permeabilidade de membrana e determinar mudanças na proporção Na^+/H^+ , aumentando os níveis de Na^+ , na atividade da K^+/ATPase e interferindo no fluxo de Ca^{2+} , envolvido na

produção de nucleotídeos, os quais modulam a síntese de DNA e RNA e, finalmente, a proliferação celular (KARU et al., 1988).

Assim como em células somáticas, os efeitos do laser de baixa potência em células gaméticas imaturas também foram pouco detalhados (OCAÑA-QUERO et al., 1998), mas algumas relações já puderam ser estabelecidas. Um dos exemplos é o transporte de cálcio, estimulado pela irradiação, o qual exerce um papel crucial durante a maturação oocitária (HOMA, 1995; HE et al., 1997). Particularmente em bovinos, estudos evidenciaram que agentes quelantes do cálcio inibiram a maturação nuclear (HOMA et al., 1991), e que sua presença também se faz necessária para a maturação citoplasmática, em especial ao conjunto do citoesqueleto (SANTELLA et al., 1999). Tais evidências sugerem uma intrínseca relação do cálcio com a competência do oócito em se desenvolver (BONI et al., 2002).

A maturação nuclear e citoplasmática de oócitos mamíferos é um processo complexo que envolve, respectivamente, a redistribuição de cromossomos e organelas. Em particular, a organização e a atividade metabólica contínuas da mitocôndria são ferramentas importantes na maturação citoplasmática, afetando, subsequentemente, o desenvolvimento após a fecundação. O estado energético dos oócitos, estimado pela quantidade de ATP, é um fator crítico para a sua maturação e é tido como um indicador para o potencial de desenvolvimento de oócitos humanos e bovinos (KRISHER, 2004). Van Blerkom et al. (1998) relataram que a quantidade de mitocôndrias no oócito afetou sua habilidade em produzir ATP, em escapar da atresia (PEREZ et al., 2000) e a suportar o desenvolvimento do embrião (REYNIER et al., 2001), verificados principalmente pelo aumento do número de mitocôndrias durante o processo de maturação oocitária (JANSEN & BÔER, 1998), na qual um oócito maturo alcance, em média, $1,6 \times 10^5$, $3,1 \times 10^5$ e $2,6 \times 10^5$ moléculas de DNA mitocondrial em camundongos, humanos e bovinos (MICHAELS et al., 1982), respectivamente (STEUERWALD et al., 2000).

Baseados em tais afirmações, somado ao fato do laser estimular eventos fotoquímicos e fotofísicos nas mitocôndrias, o processo de maturação bem como

do posterior desenvolvimento embrionário pode ser melhorado. No entanto, Ocaña-Quero et al. (1997, 1998) utilizando o mesmo tipo de laser sobre oócitos bovinos não verificaram bons resultados durante a maturação, com aumento da incidência de células que não sofreram redução meiótica, bem como elevada taxa de oócitos degenerados, evidenciados principalmente quando utilizaram uma alta densidade de energia.

Nas etapas subseqüentes à maturação oocitária *in vitro*, também existem reações dependentes da ativação de uma cascata de mecanismos moleculares e sinalizadores e que podem ser facilitados pela ação bioestimulatória do laser (PARRISH et al., 1999).

No processo de fecundação do oócito pelo espermatozóide, dois eventos são fundamentais: a capacitação espermática e a reação acrossomal. Durante a capacitação, ocorrem modificações (alterações na distribuição de proteínas, na superfície espermática, alterações na membrana plasmática, mudanças nas atividades enzimáticas e modulação na expressão de constituintes intracelulares) (YANAGIMACHI, 1994) que tornam o gameta capaz de penetrar as barreiras do oócito e responder aos estímulos que induzem a reação acrossomal, envolvendo modificações nos níveis de cálcio intracelular e ainda, mudanças na fosforilação protéica (PARRISH et al., 1999).

Durante os eventos da capacitação, destaca-se a atuação do AMP cíclico (AMPc), como segundo mensageiro intracelular, gerado pelo aumento da atividade da adenil ciclase (AC), levando à abertura dos canais de cálcio acrossomais (VISCANTI & KOPF, 1998; SPUNGIN & BREITBART, 1996). O cálcio que penetra no espermatozóide segue dois caminhos: ou é conduzido até o acrossomo, via ATPase presente no acrossomo, ou é expulso via ATPase de cálcio presente na membrana plasmática (BALDI et al., 2000). Destaca-se ainda na capacitação a fosforilação da proteína tirosina e elevação do pH intracelular, potencial de membrana e de radicais livres (VISCANTI & KOPF, 1998). Após a capacitação, o espermatozóide está apto a ligar-se à zona pelúcida e desencadear uma série de eventos bioquímicos (PARRISH et al., 1999). Neste contexto, a irradiação a laser

sobre o espermatozóide pode determinar um aumento no transporte de Ca^{2+} (LUBART et al., 1992), bem como o aumento da motilidade (MARIN & VÉLEZ, 1980), pois o transporte de Ca^{2+} nas células e interior mitocondrial é determinado pelo processo de respiração, absolutamente dependente da presença de fosfato e substratos mitocondriais (BREIDBART et al., 1990).

A ATPase de cálcio descrita anteriormente como reguladora do fluxo de cálcio no espermatozóide pode ser controlada por alguns sistemas, dentre eles: o sistema de troca $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$, a bomba de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ na membrana plasmática (FRASER, 1995) e os canais intracelulares específicos de cálcio (BLACKMORE, 1992; O'TOOLE et al., 2000). Dessa forma, não só o cálcio, mas outros íons tais como Na^+ , K^+ e Cl^- têm sido revelados como moduladores na capacitação (ZENG et al., 1995).

Um dos mecanismos propostos para explicar os efeitos da irradiação com laser sobre as células se baseia na sua interferência no balanço iônico, pois quando ocorre a ativação do fluxo de elétrons na cadeia respiratória, pode haver um aumento na produção do ânion superóxido O^{2-} , o que resulta em respostas secundárias múltiplas, tais como um aumento na ATPase de Ca^{2+} e na concentração de Ca^{2+} , uma ativação da bomba de Na^+/K^+ e um aumento na alcalinização (KARU, 1999). Dessa forma, os mecanismos envolvidos na capacitação espermática e reação acrossomal devem ser beneficiados quando se utiliza a irradiação a laser de baixa potência, uma vez que foi verificado uma ativação dos íons Na^+ e K^+ celulares quando se utilizou o laser He-Ne em eritrócitos humanos, confirmando a hipótese proposta de interferência do laser no balanço iônico (MOROZ, 1983).

Além das alterações no balanço iônico celular, os ânions superóxido O^{2-} , bem como o H_2O_2 , estimulam a fosforilação da tirosina e de muitas proteínas, principalmente após a oxidação do NADPH endógeno (AITKEN et al., 1995), revelando-se também importantes na transmissão do foto-sinal e levando, num último momento, ao aumento na proliferação celular (CALLAGHAN et al., 1996a; COHEN et al., 1998). Tal suposição é reforçada se considerado o fato do H_2O_2

participar de um complexo de reações mitocondriais para a regulação do metabolismo celular (KARU et al., 1993), na qual os radicais livres são importantes na peroxidação lipídica e, conseqüentemente, na viabilidade espermática (STOREY, 1997), principalmente com relação ao H_2O_2 (de LAMIRANDE & CAGNON, 1995), que experimentalmente foi verificado sua absorção pela mitocôndria, servindo como fonte adicional de elétrons para a fosforilação oxidativa do ADP (MAILER, 1990).

Além do balanço iônico e do pH, outros elementos também são fundamentais durante a capacitação, tais como a fosforilação de proteínas, principalmente de tirosina e a atividade da Proteína Quinase A (PKA), que estão em níveis elevados durante o processo (VISCANTI et al., 1999; PARRISH et al., 1994; UGUZ et al., 1994; VISCANTI & KOPF, 1998) e estão relacionadas entre si, pois a fosforilação é estimulada pela PKA (VISCANTI & KOPF, 1998), que pode ser ativada pelo AMPc (que ao mesmo tempo o estimula), bem como a atividade da AC e a fosforilação da tirosina, as quais são estimuladas pelo Ca^{2+} e pelos ânions bicarbonato (HCO_3^-) (VISCANTI et al., 1990; GARTY & SALOMON, 1987), que, em especial, penetra no espermatozóide por meio de bombas iônicas (VISCANTI & KOPF, 1998), podendo ser o responsável pelo aumento do pH intracelular, observado durante a capacitação (UGUZ et al., 1994; ZENG et al., 1996).

Durante o processo de ativação, promovido pela interação espermatozóide-oócito, uma série de alterações fisiológicas ocorre no gameta feminino, como o transporte de íons para o exterior celular e hiperpolarização do potencial de membrana, dependentes de cálcio (TOSTI et al., 2002).

Sabe-se que a qualidade de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* ainda se apresenta inferior aos produzidos *in vivo*, evidenciados pela presença de citoplasmas mais escurecidos e com menor densidade (conseqüência de sua alta concentração lipídica), zona pelúcida mais frágil, redução nos mecanismos de comunicação intercelular e a alta incidência de anormalidades cromossômicas, acarretando em um baixo desenvolvimento, baixas taxas de implantação, menor

tolerância à criopreservação, e ainda, a ocorrência da síndrome do bezerro gigante (RIZOS et al., 2002b). A produção de embriões bovinos é determinada não somente pela qualidade do oócito, mas também pelo sistema de cultivo, que pode alterar a expressão de RNAs mensageiros correspondentes a genes importantes no desenvolvimento embrionário (RIZOS et al., 2002b). É durante o cultivo que ocorrem os processos fundamentais para o desenvolvimento embrionário, tais como: 1) primeira clivagem; 2) ativação do genoma embrionário; 3) compactação da mórula (estabelecimento do primeiro contato célula-célula no embrião) e 4) formação do blastocisto (desenvolvimento do trofoblasto e a massa celular interna). Certamente, quaisquer modificações que interfiram no meio de cultivo, podem afetar um ou mais desses processos, modificando a qualidade embrionária (RIZOS et al., 2002a,b).

Além das diferenças morfológicas, ultra-estruturais, fisiológicas e genômicas (HOLM & CALLESEN, 1998; KRUIP & DENDAAS, 1997), os embriões produzidos *in vivo* diferem dos embriões PIV no que se refere ao seu metabolismo (RIEGER, 1992; GARDNER, 1998), pois as condições de substratos energéticos *in vitro* determinam um processo de estresse, limitando o desenvolvimento (KHURANA & NIEMANN, 2000). Tal estresse é comprovado pelas altas taxas de lactato produzidas, uma vez que blastocistos mamíferos PIV apresentam uma alta necessidade energética, utilizada nos processos de compactação, expansão e formação da blastocela (BENOS & BALABAN, 1980). As alterações ocorridas na composição e nas condições dos sistemas de cultivo *in vitro*, comparadas ao sistema *in vivo*, determinam uma alteração no padrão de expressão gênica do embrião (OLIVEIRA et al., 2005; NIEMANN & WRENZYCKI, 2000; NIEMANN & WRENZYCKI, 2002, WRENZYCKI et al., 2005). Durante o período de pré-implantação embrionária, inicia-se a expressão de genes responsáveis pela cinética do desenvolvimento inicial e pela coordenação dos mecanismos homeostáticos e metabólicos, dentre eles, o responsável pela replicação do DNA NAP1L1 (Conjunto de Proteínas-1 semelhante ao Nucleossomo-1), regulação na transcrição (NFLC - Fator Nuclear Semelhante a Citocina), regulação na seleção

de proteínas e no transporte de membranas (PSCD2), controle do ciclo celular e transmissão de sinais (TESFAYE et al., 2004), indução da apoptose (Bax) (LONERGAN et al., 2006) ou sua inibição (alivina 1) (TESFAYE et al., 2004), formação de junções gap (Cx43) e interação com receptores (LONERGAN et al., 2006).

Um trabalho desenvolvido por Corcoran et al. (2006) constatou que dentre 384 genes ou ESTs (expressed sequence tags) identificados em blastocistos bovinos, aproximadamente 85% deles apresentaram uma expressão reduzida em embriões cultivados *in vitro* quando comparados *in vivo*, o que pode afetar tanto o desenvolvimento embrionário como o fetal (LAZZARI et al., 2002). Em embriões de camundongo, por exemplo, Ecker et al. (2004) e Fernandez-Gonzalez et al., (2004) indicaram que o sistema de cultivo *in vitro* pode gerar conseqüências em longo prazo irreversíveis, podendo afetar o desenvolvimento, crescimento, fisiologia e comportamento pós-natais. Portanto, as condições de cultivo no período após a fertilização podem ter efeitos drásticos na quantidade relativa de RNAm de muitos genes importantes relacionados ao desenvolvimento embrionário.

Com a bioestimulação, portanto, pode-se tentar mimetizar os padrões na expressão de RNAm que ocorrem *in vivo*, pois sabe-se que a irradiação com laser afeta os níveis dos nucleotídeos cíclicos, os quais modulam a síntese de DNA e RNA (KARU et al., 1998). No entanto, raros são os esforços no intuito de averiguar uma possível ação benéfica da bioestimulação com laser sobre o período de cultivo *in vitro* de embriões.

Portanto, com base nas informações anteriores acerca da bioestimulação pelo laser, efeitos benéficos podem ser oferecidos não somente nos eventos de maturação e fecundação, mas também durante o desenvolvimento embrionário, uma vez que o laser pode oferecer maior energia para a célula irradiada, e ainda um maior incremento na síntese de DNA e RNA.

3. Considerações sobre o laser

A palavra LASER é uma sigla de origem inglesa e significa “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation” (Amplificação de Luz por Emissão Estimulada de Radiação). Trata-se de uma radiação eletromagnética não ionizante que por apresentar características particulares vem sendo explorada nas mais diversas áreas, que vão desde a automatização das indústrias e das comunicações até a área médica e de pesquisa básica.

O laser pode ser descrito, numa maneira simplificada, como sendo uma fonte luminosa que utiliza a luz emitida por um átomo ou molécula para estimular a emissão de mais luz por outros átomos ou moléculas, e, neste processo, amplificar a luz original. O equipamento de laser é formado, basicamente, por uma fonte de energia, um meio amplificador (sólido, líquido ou gasoso) e um tubo de ressonância (cavidade óptica que possui espelhos em suas extremidades) (Figura 1).

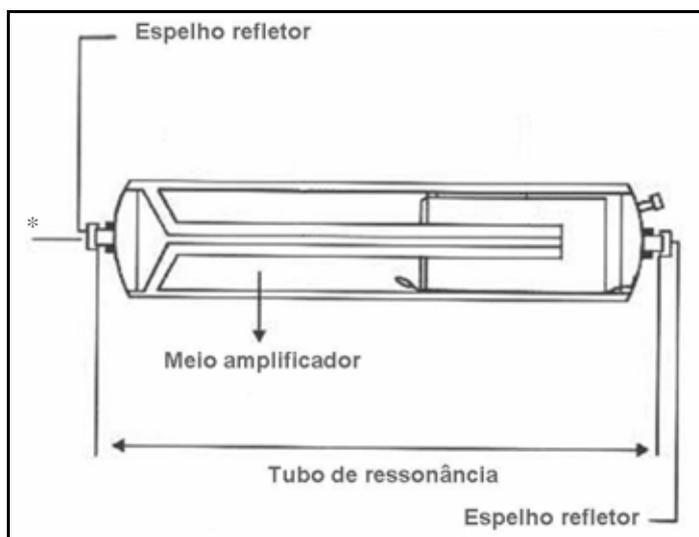


Figura 1. Esquema representativo de um equipamento de laser com seus componentes: meio amplificador, tubo de ressonância, espelhos refletores, *feixe de laser. (Adaptado de PÉCORA & BRUGNERA JÚNIOR, 1999).

A geração de um feixe de laser segue uma cadeia de eventos na qual a energia liberada pela fonte estimula os átomos contidos no meio amplificador a um

estado de excitação, em seguida a um estado intermediário e, finalmente, a um estado de repouso. Quando a maioria dos átomos se encontra no estado intermediário de excitação, ocorre liberação de energia em forma de calor. A essa situação, atribui-se o nome de inversão de população, ou seja, quando existem mais átomos excitados do que átomos no estado fundamental. Porém, quando ocorre passagem para o estado de repouso, fótons de luz são liberados, ocorrendo a emissão estimulada de radiação. Para amplificar a cadeia, ou seja, para gerar um laser, o meio amplificador deve ficar contido em cavidade óptica, a qual possui espelhos em suas extremidades que permitem que os fótons se desloquem de um lado ao outro da cavidade, estimulando outros átomos no estado intermediário a retornarem ao repouso, liberando, assim, novos fótons em progressão logarítmica. Dessa forma, obtém-se uma reação em cadeia com a produção de alta quantidade de energia em curto período de tempo. A radiação produzida dentro da cavidade do laser pode ser extraída, por exemplo, por um pequeno orifício central em um dos espelhos das extremidades, originando o feixe unidirecional de luz.

Todos os tipos de fontes de luz, dentre elas as fluorescentes ou as de lâmpadas comuns, são caracterizados por frequência, comprimento de onda e energia. Com a luz laser não é diferente, no entanto, essas características se aplicam a ela de maneira singular, o que lhes permite a sua vasta aplicabilidade nas mais diversas áreas. O detalhamento de suas particularidades é, portanto, fundamental para a compreensão do seu mecanismo de ação.

3.1. Características físicas do laser

3.1.1 Comprimento de onda único

A luz laser é emitida em ondas e a distância percorrida por uma onda eletromagnética, em uma oscilação completa, é chamada de comprimento de onda (λ), expresso em nanômetros (nm - a bilionésima parte do metro) e a

frequência de suas oscilações, ou seja, quantas ondas passam em um determinado ponto por segundo, em Hertz (Hz) (PORTER, 1998a). Enquanto a luz de uma lâmpada convencional é formada por radiações de diversos comprimentos de onda, ou seja, por várias cores que, somadas, resultam na luz branca, a luz laser apresenta-se monocromática, resultado de um comprimento de onda único.

O comprimento de onda do laser é definido pelo meio amplificador utilizado, que pode ser sólido (ex: cristais, semicondutores), gasoso (ex: hélio, argônio, dióxido de carbono) ou líquido (ex: rodamina) (TAKAC & STOJANOVIC, 1999). Variando-se o elemento, varia-se o comprimento de onda produzido por ele, que se estende desde o infravermelho distante ($\geq 200 \mu\text{m}$) até o ultravioleta distante ($\leq 200 \text{ nm}$) (Figura 2).

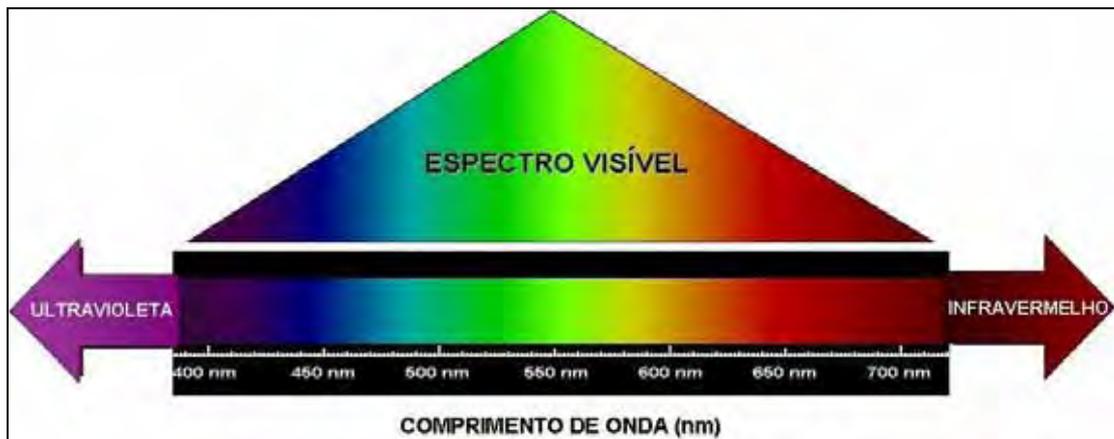


Figura 2. Esquema representativo do espectro eletromagnético com suas diferentes regiões e comprimentos de onda. (adaptado de Princeton University [On line], disponível em <<http://web.princeton.edu/sites/ehs/laserguide/index.htm>>, 2007).

O comprimento de onda determina a interação entre o laser e a célula, pois define a especificidade de sua interação fotobiológica e de seus efeitos terapêuticos (LOW & REED, 2001), ou seja, é definido pela profundidade de penetração do laser no tecido.

À medida que uma molécula recebe determinada radiação eletromagnética, produz-se uma energia extra que pode ser utilizada pela própria molécula em suas reações químicas, ou ainda, na sua interação com moléculas vizinhas, estimulando, em última instância, as reações biológicas dentro das células (PORTER, 1998a).

Radiações emitidas na região do ultravioleta e na região do infravermelho médio apresentam alto coeficiente de absorção pela pele, enquanto na região do infravermelho próximo (820 nm e 840 nm) constata-se baixo coeficiente de absorção, implicando em máxima penetração no tecido (KARU, 1985; 1987).

3.1.2 Direção, colimação e polarização

A radiação *laser*, além de possuir um único comprimento de onda, possui a mesma fase, ou seja, os picos e as depressões dos campos elétricos e magnéticos ocorrem ao mesmo tempo (coerência temporal) e na mesma direção (coerência espacial), sendo esta mais uma característica que difere a luz laser da luz comum (BAXTER, 1997).

A colimação consiste no alto grau de paralelismo do feixe laser, indicando divergência angular mínima ao longo da distância percorrida, garantindo que a energia do laser se concentre precisamente em um ponto focal. Esse efeito de unidirecionalidade é responsável por danos em tecidos oculares quando se manuseia o laser sem a devida proteção (TUNER & HODE, 1996; LOW & REED, 2001).

A polarização ocorre quando as ondas de luz estão orientadas em um só plano, de tal modo que as vibrações em seus campos elétricos acontecem em uma única direção. Essa propriedade, por sua vez, caracteriza a emissão de fótons unidirecionais e paralelos entre si (TUNER & HODE, 1996; LOW & REED, 2001; RIBEIRO et al., 2004).

3.2 Padrões de irradiação

3.2.1 Potência óptica útil

A potência óptica útil é definida como a energia emitida em um segundo, cuja unidade é comumente expressa em Watts (W) ou milliwatts (mW). Um laser será mais potente quanto maior for a energia gerada por segundo, tendo em vista que a efetividade da radiação laser depende da quantidade de energia que, ao ser absorvida, promoverá modificações em determinadas reações (KITCHEN & BAZIN, 1996; BAXTER, 1997).

De acordo com a potência de emissão de irradiação, os lasers são classificados em: lasers de alta, média e baixa intensidade. Os primeiros, também conhecidos como lasers cirúrgicos, emitem irradiação de alta potência, o que propicia sua capacidade destrutiva e, portanto, a possibilidade de serem utilizados para cortar, vaporizar, coagular e esterilizar tecidos, como por exemplo, os lasers de argônio, rubi e CO₂ (BRUGNERA JÚNIOR et al., 2003; GENOVESE, 2000). Já os lasers intermediários emitem radiações com potências medianas, sem poder destrutivo, tendo uma maior aplicação em fisioterapia, cujos principais representantes são o laser de Hélio e Neônio (He-Ne) e o Arseniato de Gálio (As-Ga) (GENOVESE, 2000). Os lasers de baixa intensidade, também denominados lasers terapêuticos, emitem radiações de baixa potência, e possuem uma ação fotoquímica analgésica, antiinflamatória e de bioestimulação tecidual (exemplo: lasers de He-Ne e diodo; Arseniato de Gálio e Arseniato de Gálio e Alumínio – As-Ga-Al) (BRUGNERA JÚNIOR et al., 1991; MELLO & MELLO, 2001).

3.2.2 Irradiância e fluência

A irradiância, ou densidade de potência, é definida como a potência óptica de saída do laser em Watts (W), dividida pela área irradiada em centímetro quadrado (cm²) e a sua manipulação pode determinar diferentes utilidades para o laser no tecido. (KITCHEN & PARTRIDGE, 1991; BAXTER, 1997).

A fluência, ou densidade de energia, consiste na energia total transmitida por um feixe de laser por unidade de área, sendo expressa em Joules (J) /cm² e calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Fluência (J /cm}^2\text{): } \frac{\text{potência (W) x tempo (segundos)}}{\text{área de radiação (cm}^2\text{)}}$$

A fluência ideal da irradiação laser depende de vários fatores, dentre eles: a distância entre o inóculo e o feixe de saída da luz, a metodologia de aplicação, o sistema de condução de luz (direto ou com fibra óptica) e a profundidade do tecido, além de características inerentes à irradiação, como reflexão, refração, dispersão, transmissão e absorção do feixe, bem como o tecido a ser irradiado e seu estado fisiológico prévio (BECKERMAN et al., 1992).

Karu (1989) defende que a eficácia da irradiação laser está intensamente relacionada com uma fluência adequada, aplicada de modo regular e gradual, de maneira que fluências baixas ou altas podem não produzir efeitos ou gerar prejuízos, respectivamente.

3.2.3 Emissão contínua ou pulsada

A luz gerada pelo laser pode ser liberada de modo contínuo, pseudocontínuo e pulsado. Os lasers contínuos emitem energia de maneira constante. Os pseudocontínuos são, na realidade, pulsados, mas, os pulsos são muito rápidos, e o intervalo entre eles é extremamente curto, gerando energia virtualmente contínua. Os pulsados emitem energia com pulsos variáveis (de nanosegundos a milisegundos) e intervalos também variáveis (PORTER, 1998a), de forma que a intensidade do feixe pode ser intensa, já que uma grande quantidade de energia é acumulada em longo tempo e emitida integralmente em um curto intervalo de tempo. Quanto mais curto for o pulso, maior deverá ser a irradiância a fim de alcançar energia suficiente para obtenção de efeito térmico.

3.3 Aplicações terapêuticas do laser

3.3.1 Histórico

No início do século XX, surgiu a teoria de que a alteração no arranjo molecular de um átomo poderia gerar luz com uma frequência particular. Seu autor, Albert Einstein, acabava de postular no ano de 1917 o primeiro conceito de emissão estimulada, cujos princípios sustentam o funcionamento do laser (PORTER, 1998a). Em 1960, Theodore Maiman foi o pioneiro a desenvolver um equipamento emissor de ondas coerentes de luz pela excitação de um cristal de rubi, gerando o primeiro raio laser (MAIMAN, 1960). Seis anos depois, Endre Mester demonstrou pela primeira vez os efeitos do laser operando em baixa potência, quando relatou a ação bioestimulatória dos lasers de rubi e argônio no tratamento de úlceras de pele em ratos (MESTER, 1966). Em meados dos anos 60, Javan, Bennet e Herriott construíram o laser de He-Ne que se tornou a primeira fonte de luz coerente disponível comercialmente (KITCHEN & BAZIN, 1996; BAXTER, 1997; TUNER & HODE, 1999). No entanto, os lasers de He-Ne apresentavam grande dimensão e meia vida extremamente curta, além de trabalharem numa região visível do espectro eletromagnético, o que reduzia sua penetração no tecido e limitava sua utilização (ALMEIDA-LOPES, 1999). Surgiu então o interesse de produzir um equipamento com emissão na faixa do infravermelho, o que só foi possível na década de 70 com o surgimento dos diodos condutores, possibilitando a confecção de equipamentos de As-Ga e de As- Ga- Al (OHSHIRO, 1991; BAXTER, 1997; TUNER E HODE, 1999). A partir dos anos 90, outras variedades de diodos laser foram criados gerando uma grande variedade de comprimentos de onda. Graças a estes dispositivos pode-se ter hoje em dia equipamentos pequenos, de fácil transporte e manuseio, com baixa frequência de manutenção, além de baixo custo, possibilitando a vasta utilização desta tecnologia.

3.3.2 Conceito de bioestimulação e laserterapia

O termo bioestimulação foi adotado por Mester (1969) para denominar os efeitos conseguidos com a irradiação de lasers operando em baixa potência. Por um determinado período de tempo a terminologia bioestimulador permaneceu na literatura como sinônimo para designar esse tipo de laser, já que na época ainda não se conhecia detalhadamente seu mecanismo de ação. Essa terapia era empregada muitas vezes buscando efeitos antagônicos no tecido biológico: foi utilizada para remover excessos de pigmento ou restaurá-los (SASAKI E OHSHIRO, 1989); tanto para subtrair cicatrizes deprimidas, quanto também cicatrizes hipertróficas (STRONG, 1997); no alívio da dor, ou na reabilitação da sensibilidade em áreas de parestesia ou paralisia (ROCHKIND et al., 1989). Concluiu-se então que essa terapia não somente acelerava determinados processos, mas também retardava outros, ou seja, funcionava como normalizadora das funções. Hoje o termo biomodulação é utilizado para nomear tanto os efeitos estimulatórios como os inibitórios do laser de baixa potência (BECKERMAN et al., 1992; SCHAFFER et al., 1997; DE BIE et al., 1997).

De acordo com o estado fisiológico e o tipo de tecido que integra, cada célula apresenta um determinado limiar de sobrevivência, que pode ser modulado de acordo com a energia a ela oferecida. Caso uma baixa intensidade de energia lhe seja ofertada, a sua biomodulação será induzida, ou seja, esta célula utilizará essa energia buscando manter ou normalizar suas funções, por meio da estimulação de sua membrana e suas organelas. A isso denomina-se Laser Terapia (ALMEIDA-LOPES, 1999).

Historicamente, o interesse em utilizar a luz com finalidades terapêuticas existe desde os primórdios da civilização, quando árabes, gregos e romanos difundiram diversas formas de terapia com luz solar para o tratamento de doenças de pele. Atualmente, a fotobiomodulação é praticada em todo o mundo, sendo o laser uma das fontes de luz mais exploradas nessa terapia (BRUGNERA-JÚNIOR E PINHEIRO, 1998).

Os trabalhos iniciais da terapia com laser de baixa intensidade começaram no final da década de 60 e início dos anos 70 na Europa Oriental, onde foram observados os efeitos dessa irradiação na modulação dos processos biológicos. Desde então a LLLT (Low Level Laser Therapy) tornou-se uma modalidade de tratamento popular, principalmente na União Soviética e Europa Oriental (BASFOR, 1989; KITCHEN & BAZIN, 1996).

Na Europa Ocidental, um dos primeiros trabalhos foi do Dr. Friedrich Plog, em 1973, que estudou os efeitos do laser em pontos de acupuntura (BAXTER, 1997) e, oito anos depois, foi relatado pela primeira vez o uso clínico de um diodo laser de As-Ga-Al para atenuação de dor (CALDERHEAD, 1998).

Atualmente, a LLLT é empregada objetivando-se maior qualidade e rapidez no processo reparacional (quadros pós-operatórios, reparação de tecido mole, ósseo e nervoso); a mediação em inflamações com quadros de edema instalado; ou ainda, a atenuação em quadros de dor crônica ou aguda.

As radiações utilizadas na terapia com laser de baixa potência estão situadas na porção visível do espectro eletromagnético, bem como na região do infravermelho próximo. Os comprimentos de onda mais utilizados se encontram entre 600 e 1000 nm e são relativamente pouco absorvidos, apresentando, portanto, uma boa transmissão na pele e nas mucosas (RIGAU, 1996).

3.3.3 Bioestimulação *in vivo*

Ao absorver a energia de lasers de baixa potência, biomoléculas específicas existentes na célula sofrem excitação elétrica que se traduzem em reações químicas, como oxidação, redução, ruptura de ligações covalentes ou interação com outras biomoléculas, as quais acarretam diferentes efeitos teciduais de natureza trófico-regenerativa, antiinflamatória e analgésica (PARRISH et al., 1985), que podem ser clinicamente manifestados de três modos. Primeiramente podem: 1) agir diretamente na célula, produzindo um efeito primário ou imediato, de forma a aumentar o metabolismo celular (BOLTON et al. 1995), a síntese de endorfinas e diminuir a liberação de transmissores nociceptivos, como a

bradicinina e a serotonina (ATAKA et al., 1989), além de estabilizar as membranas celulares (PALMGREN, 1992), observando-se clinicamente uma ação estimulatória e analgésica dessa terapia; 2) agir secundariamente ou indiretamente na célula, traduzido por uma ação mediadora da inflamação, como por exemplo, no aumento do fluxo sanguíneo (KUBOTA & OHSHIRO, 1989) e da drenagem linfática (LIEVENS, 1991); 3) agindo tardiamente na célula, por exemplo, por meio da ativação do sistema imunológico (VÉLEZ-GONZÁLEZ et al., 1994).

Devido a esses efeitos, o laser de baixa potência tem sido empregado freqüentemente em múltiplas especialidades da odontologia e da medicina humana e veterinária. De uma maneira resumida, há três principais áreas de aplicação da LLLT: (a) cicatrização de feridas, reparação de tecidos e prevenção da morte tecidual; (b) diminuição da inflamação em doenças crônicas e injúrias associadas à dor e edema; (c) diminuição da dor neurogênica e de alguns acometimentos dessa ordem (HAMBLIM & DEMIDOVA, 2006). Dessa forma, a terapia com laser de baixa potência tem sido empregada rotineiramente na bioestimulação óssea, em casos de implantes e cirurgias; na redução da dor e edema em pós-operatórios e inflamações diversas; na recuperação em quadros de paralisias e parestesias, na cicatrização de queimaduras e enxertos, ativando a vascularização das regiões afetadas (KERT & ROSE, 1989), ou ainda, no tratamento de ulcerações diversas, dentre outros. Nos campos da fisioterapia, tem sido utilizada em casos de acometimentos músculo-esqueléticos, como distensões e contraturas musculares, promovendo analgesia (TUNER & HODE, 1996). Com objetivos semelhantes, sua aplicação também tem se intensificado no campo da veterinária, especialmente em centros hípicas e clínicas de reabilitação e medicina do esporte (HAMBLIM & DEMIDOVA, 2006).

Apesar da variedade de metodologias e das várias fontes de laser com diferentes parâmetros, há um consenso quanto à utilização dos comprimentos de onda a serem utilizados, sendo que os comprimentos entre 600 e 700 nm são escolhidos para o tratamento de tecidos superficiais e os comprimentos entre 780

e 950 nm para tecidos de localização mais profunda. Comprimentos de onda entre 700 e 770 nm são considerados como não muito ativos (HAMBLIM & DEMIDOVA, 2006), porém outros padrões de irradiação como irradiância, fluência e modo de operação (contínuo ou pulsado) permanecem muito variáveis, dependendo da finalidade de uso.

3.3.4 Bioestimulação *in vitro*

Os estudos *in vitro* dos efeitos do LLLT tem avançado e contribuído muito, pois reduzem a dificuldade de interpretação dos resultados em estudos *in vivo*, os quais apresentam grande variedade nos modelos estudados (devido à variação interespecífica e interindividual) e nos padrões de tratamento (KITCHEN & PARTRIDGE, 1991).

Além da comprovação dos efeitos da LLLT em modelos animais e estudos clínicos em humanos, sua ação tem sido evidenciada em diversas culturas de microorganismos e de células de mamíferos. De um modo geral, as respostas celulares observadas *in vitro* após a irradiação com laser de baixa potência envolvem o estímulo do metabolismo, migração e proliferação celular, e o aumento da síntese e secreção de proteínas (HAMBLIM & DEMIDOVA, 2006).

Dentre os modelos mais estudados, estão as células envolvidas na cicatrização, como as endoteliais (MOORE et al., 2005), os fibroblastos (HAWKINS & ABRAHAMSE, 2005), os queratinócitos (YU et al., 2003) e algumas classes de neutrófilos, tais como os macrófagos (YOUNG et al., 1989) e neutrófilos (FUJIMAKI et al., 2003); as células envolvidas na atenuação da dor e na regeneração nervosa, como neurônios (CHEN et al., 2005; MILORO et al., 2002; BALABAN et al., 1992) e células da glia (BYRNES et al., 2005), além das células participantes em processos anti-inflamatórios e anti-edema, como os macrófagos (YOUNG et al., 1989), mastócitos (EL SAYED & DYSON, 1996), neutrófilos (LOPES-MARTINS et al., 2005) e linfócitos (AGAIBY et al., 2000).

Para verificação de alterações no padrão de expressão gênica, ZHANG e colaboradores (2003) avaliaram 9982 genes de fibroblastos cultivados *in vitro* e

bioestimulados com diodo laser durante 3 dias, relatando a super expressão em 111 genes, todos relacionados a processos antioxidativos, metabolismo energético e cadeia respiratória.

Também em cultivos de osteoblastos efeitos de diferenciação e de proliferação foram observados utilizando-se laser He-Ne operando em 632 nm (STEIN et al., 2005) e 830 nm (RENNO et al., 2007), bem como o aumento da atividade e a expressão de fatores osteogênicos, como a fosfatase alcalina e a osteopontina e ainda na replicação do DNA nessas células (KUSAKARI et al., 1992; YAMAMOTO, 2001).

Em cultivos de fibroblastos, a ação moduladora da LLLT foi observada em diferentes aspectos, desde a síntese de colágeno e de proteínas até a sua proliferação (KARU, 1990; AL-WATBAN & ZHANG; HAWKINS & ABRAHAMSE, 2005), o que pode ser verificado por Pourreau-Scneider et al. (1989), Lubart et al. (1992) e Loevschall & Arenholt-Bindslev (1994) que, respectivamente, verificaram uma proliferação interna de fibroblastos gengivais humanos (laser de He-Ne), um aumento significativo no número de mitoses (diodo laser em diferentes comprimentos de onda e fluências até $15\text{J}/\text{cm}^2$) e aumento na síntese de DNA (diodo laser operando em 812 nm e fluência $459\text{ J}/\text{cm}^2$), confirmado por Webb et al. (1998) (diodo laser em 660 nm e fluências de 2,4 e $4\text{ J}/\text{cm}^2$).

Células envolvidas em processos de angiogênese foram avaliadas quanto aos efeitos da irradiação com laser de baixa potência. Após a irradiação de células de língua de ratos com laser visível operando em 632,8 nm (potência de 4mW e fluência de $2,4\text{ J}/\text{cm}^2$) detectou-se um aumento de 100% na quantidade de histamina, além de uma grande vasodilatação e degranulação ativa de mastócitos (TRELLES et al., 1988; TRELLES et al., 1989), fato este também verificado por EL SAYAD E DYSON (1996) que conseguiram maior número de mastócitos, porém sem degranulação, ao utilizarem diodo lasers com diferentes comprimentos de onda (660, 820, 870, 880, 940, 950 nm) sobre modelo animal.

Em células da linhagem sangüínea VISCOR et al. (1989) testaram um laser de HeNe ($0,5\text{ mW}/\text{cm}^2$) sobre eritrócitos e notaram alteração da membrana sem,

no entanto, alterar sua estrutura, efeito que posteriormente foi confirmado por SIPOSAN E LUKACS (2000). Em neutrófilos humanos, o uso de diodos lasers de Ga-Al-As operando em 830 e 904 nm estimulou sua atividade fagocitária. Em células hematopoiéticas, CALLAGHAN et al. (1996b) utilizando diodo laser visível (660nm; 2,9 e 8,6 J/cm²) observaram um aumento significativo na síntese de DNA destas células. Em linfócitos, OHTA et al. (1987), utilizando diodo laser de As-Ga (10,8mJ/cm²), notaram inibição da proliferação celular, o que também foi observado por INOUE e colaboradores (1989), quando irradiaram linfócitos com diodo laser de As-Ga-Al (fluências de 14,2 e 28,3 mJ/cm²), mas ao utilizarem uma fluência de 849 mJ/cm², houve um aumento da replicação celular. Quando irradiados com laser de Argônio, os linfócitos apresentaram índice mitótico inversamente proporcional à fluência, ao passo que suas rupturas cromossômicas aumentaram proporcionalmente à ela (CHIO, 1990). O fluxo iônico celular também mostrou-se influenciável pela fotoestimulação, de acordo com KARU (1991), que irradiou linfócitos por alguns minutos com laser He-Ne (fluência de 56 J/cm²) e produziu um aumento no fluxo de íons cálcio a curto prazo, além da síntese de DNA a longo prazo. Além da síntese de DNA, a síntese de ATP e de ADP se alteraram durante a irradiação a laser de linfócitos (VOLPI et al., 1995). Uma elevação transitória no fluxo de cálcio também foi observada em células musculares esqueléticas após a irradiação com laser de He-Ne (633 nm) com energia de 3J/cm² (SCHWARTZ et al., 2002).

A investigação sobre os efeitos *in vitro* da LLLT não se restringe ao cultivo celular, mas também tem se expandido ao cultivo de microorganismos. Karu et al. (1994), ao irradiar culturas de *Escherichia coli*, com lasers de 623.8, 1066 e 1286 nm, observaram que o número de bactérias viáveis no grupo irradiado era muito maior do que no grupo controle, levando à conclusão de que os lasers induziram o crescimento de culturas bacterianas. Posteriormente, NUSSBAUM et al. (2003) mostraram que os efeitos da LLLT sobre culturas bacterianas variam muito com a irradiância e o tipo de espécie cultivado. Em cultivos de *Pasteurella aeruginosa*, altas irradiâncias (1-20 J/cm²) afetaram negativamente seu crescimento, mas não

apresentaram o mesmo efeito sobre *Escherichia coli*, que aumentou sua taxa proliferativa independente da irradiância aplicada.

3.4 Mecanismos de ação do laser visível e infravermelho

As irradiações laser freqüentemente utilizadas na fototerapia encontram-se em uma faixa de espectro variando entre a luz visível e infravermelha, as quais interagem com os tecidos por diferentes vias metabólicas (KARU, 1988).

De uma maneira geral, com a absorção dos fótons aportados pela radiação, as moléculas adquirem um estado clinicamente excitado (mudança do potencial redox), influenciando na regulação e cinética da respectiva via bioquímica. Esta alteração focal serve como um gatilho para uma série de alterações bioquímicas em cadeia que culminam com a mudança das funções metabólicas e proliferativas de uma célula (KARU, 1998).

No entanto, os mecanismos de resposta das células à radiação diferem devido à absorção seletiva de seus fótons por estruturas celulares denominadas cromóforos (fotoreceptores não especializados). Karu (1988) descreveu um mecanismo de ação diferente para os lasers emitindo radiação na região do visível e do infravermelho próximo, baseados nessa absorção (Figura 3).

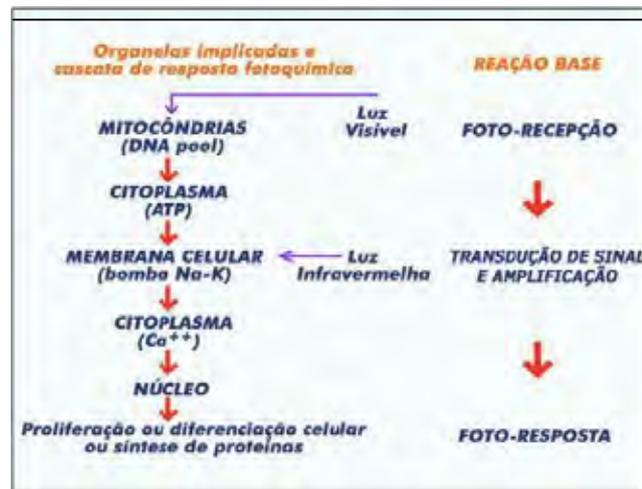


Figura 3. Esquema representativo dos mecanismos de ação do laser operando na região do visível e do infravermelho próximo (adaptado de ALMEIDA-LOPES, 2003).

A luz laser visível tem como primeiros alvos os lisossomos e as mitocôndrias das células, que após absorvê-la, desencadeiam o início de reações foto-químicas, ativando diretamente a síntese de enzimas (BOLTON et al., 1995). Já a luz infravermelha tem como seus primeiros alvos as membranas celulares, que ao serem irradiadas, absorvem os fótons da fonte luminosa, e então alteram seu potencial (PASSARELA et al., 1984), induzindo os efeitos foto-físicos e foto-elétricos, causando o choque entre células, traduzidos intracelularmente por um incremento na síntese de ATP (COLLS, 1986).

Os incrementos de ATP mitocondrial aumentados com a irradiação a laser podem, portanto, favorecer o metabolismo celular em um variado número de reações (PASSARELA et al., 1984).

4. Objetivos

4.1 Objetivo geral

O presente trabalho visa investigar os efeitos dos lasers de baixa potência (semicondutor operando em 780 nm - infravermelho e 660 nm - visível) ao longo do processo de produção *in vitro* de embriões bovinos, avaliando-se diferentes aspectos da MIV, FIV e CIV.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Efeitos sobre a MIV

Avaliar os efeitos da irradiação com laser semicondutor operando em 780 nm (infravermelho) e 660 nm (visível) na maturação nuclear *in vitro* de oócitos bovinos, por meio da coloração de cromatina.

Avaliar os efeitos da irradiação com laser semicondutor operando em 780 nm (infravermelho) e 660 nm (visível) na maturação citoplasmática *in vitro* de oócitos bovinos, por meio da coloração de grânulos corticais.

Avaliar os efeitos da irradiação com laser semicondutor operando em 780 nm (infravermelho) e 660 nm (visível) na maturação *in vitro* de oócitos bovinos, por meio da porcentagem de blastocistos produzidos ao sétimo dia de cultivo *in vitro*.

4.2.2 Efeitos sobre a FIV

Avaliar os efeitos da irradiação com laser semicondutor operando em 780 nm (infravermelho) e 660 nm (visível) em espermatozóides bovinos, por meio da porcentagem de estruturas clivadas e de blastocistos produzidos ao terceiro e sétimo dias cultivo *in vitro*, respectivamente.

Avaliar os efeitos da irradiação com laser semicondutor operando em 780 nm (infravermelho) e 660 nm (visível) em espermatozóides bovinos, por meio da avaliação da cinética de desenvolvimento dos embriões produzidos ao sétimo dia de cultivo *in vitro*.

4.2.3 Efeitos sobre a CIV

Avaliar os efeitos da irradiação com laser semiconductor operando em 780 nm (infravermelho) e 660 nm (visível) em embriões bovinos ao terceiro dia de cultivo *in vitro*, por meio da porcentagem de blastocistos produzidos ao sétimo dia de cultivo *in vitro*.

Avaliar os efeitos da irradiação com laser semiconductor operando em 780 nm (infravermelho) e 660 nm (visível) em embriões bovinos ao terceiro dia de cultivo *in vitro*, por meio da avaliação da cinética de desenvolvimento dos embriões produzidos ao sétimo dia de cultivo *in vitro*.

Avaliar os efeitos da irradiação com laser semiconductor operando em 780 nm (infravermelho) e 660 nm (visível) em embriões bovinos ao terceiro dia de cultivo *in vitro*, por meio da contagem total do número de células nos embriões produzidos ao sétimo dia de cultivo *in vitro*.

REFERÊNCIAS

ABERGEL, R.P.; LYONS, R.F.; CASTEL, J.C.; DWYER, R.M.; UITTO, J. Biostimulation of wound healing by lasers: experimental approaches in animal models and in fibroblast cultures. **Journal of Investigative Dermatology**, v.13, p.127-133, 1987.

AGAIBY, A.D.; GHALI, L.R.; WILSON, R.; DYSON, M. Laser modulation of angiogenic factor production by T-lymphocytes. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.26, p.357-363, 2000.

AITKEN, R.J.; PATERSON, M.; FISHER, H.; BUCKINGHAM, D.W.; VAN DUIN, M. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. **Journal of Cell Science**, v.180, n.5, p.2017-2125, 1995.

ALMEIDA-LOPES, L. **Análise *in vitro* da proliferação celular de fibroblastos de gengiva humana tratados com laser de baixa intensidade utilizando diferentes parâmetros de irradiação**. 2003. 163 f. Dissertação (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2003.

ALMEIDA-LOPES, L. **Análise *in vitro* da proliferação celular de fibroblastos de gengiva humana tratados com laser de baixa potência**. 1999. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade Vale de Paraíba, 1999.

ALMEIDA-LOPES, L. Laser. **Jornal Brasileiro de Odontologia Clínica**, v.1, n.4, p.3-5, 1997.

ALMEIDA-LOPES, L. Aplicações clínicas do laser não cirúrgico. In: BRUGNERA JÚNIOR, A.; PINHEIRO, A.L.B. **Lasers na Odontologia Moderna**. São Paulo: Pancast, 1988, p. 99-120.

AL-WATBAN, F.A.H.; ZHANG, Z. Dosimetry-related wound healing response in the rat model following helium neon laser LLLT. **Laser Therapy**. v.6, p. 119-124, 1994.

ANDERS, J.J.; BORKE, R.C.; WOOLERY, S.K.; MERWE, W.P. Low power laser irradiation alters the rate of regeneration of the rat facial nerve. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.13, p.72-82, 1993.

ATAKA, I. Studies of Nd:YAG low power laser irradiation on stellate ganglion. In: **Lasers in dentistry**. Amsterdam: Elsevier, 1989, p.271.

BALABAN, P.; ESENALIEV, R.; KARU, T.; KUTOMKINA, E.; LETOKHOV, V.; ORAEVSKY, A.; OVCHARENKO, N. He-Ne laser irradiation of single identified neurons. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.12, p.329-337, 1992.

BALBONI, G.C.; BRANDI, M. L.; ZONEFRATI, R.; REPICE, F. Effects of He-Ne/I.R laser irradiation on two lines of normal fibroblasts *in vitro*. **Archivio Italiano di Anatomia e di Embryologia**, v.91, n.3, p.179-188, 1986.

BALDI, E.; LUCONI, M.; BONACCORSI, L.; MURATORI, M.; FORTI, G. Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. **Frontiers in Bioscience**, v.5, n.1, p.110-123, 2000.

BARRETO, L.S.S. 2003. **Avaliação dos efeitos do 3-isotil-1-metil-xantina (IBMX) e da roscovitina sobre a maturação nuclear, momento da fecundação e competência no desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos**. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

BASFORD, J.R. Low-energy laser therapy: controversies and new research findings. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.9, p.1-5, 1989.

BAXTER, G.D. **Therapeutic lasers: theory and practice**. United States of America: Churchill Livingstone, 1997.

BECKERMAN, H.; DE BIE, R.; BOUTER, L.; DE CUYPER, H.; OOSTENDORP, R. The efficacy of laser therapy for musculoskeletal and skin disorders: a criteria based meta-analysis of randomized clinical trials. **Physical Therapy**, v.72, p.483-491, 1992.

BEDNARSKA, K.; ROZGA, B.; KOLODZIEJCZYK, K.; SZOSLAND, D.; LEYKO, W.; BRYCZEWSKA, M. Effect of low-power red light irradiation on the viability of human skin fibroblasts. **Radiation and Environmental Biophysics**, v.37, p.215-217, 1998.

BENOS, D.J.; BALABAN, R.S. Energy requirements of developing mammalian blastocysts for active ion transport. **Biology of Reproduction**, v.23, p.941-947, 1980.

BLACKMORE, P. F.Thapsigargin elevates and potentiates the ability of progesterone to increase intracellular free calcium in human sperm: possible role of perinuclear calcium. **Cell Calcium**, v.14, p.53-60, 1992.

BOLTON, P.; YOUNG, S.; DYSON, M. The direct effect of 860nm light on cell proliferation and on succinic deshydrogenate activity of human fibroblasts *in vitro*. **Laser Therapy**, v.7, p.55-60, 1995.

BONI, R.; CUOMO, A.; TOSTI, E. Developmental Potential in Bovine Oocytes is Related to Cumulus-Oocyte Complex Grade, Calcium Current Activity, and Calcium Stores. **Biology of Reproduction**, v.66, p.836-842, 2002.

BREIDBART, H.; WEHBIE, R.; LARDY, H. Regulation of calcium transport in bovine spermatozoa. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1027, n.1, p.72-78, 1990.

BRUGNERA JÚNIOR, A.; VILLA, R.G.; GENOVESE, W.J. **Laser na Odontologia**. São Paulo: Pancast, 1991.

BRUGNERA JÚNIOR, A.; PINHEIRO, A.L.B. **Laser na Odontologia Moderna**. São Paulo: Pancast, 1998.

BRUGNERA JÚNIOR, A.; SANTOS, A.E.C.G.; BOLOGNA, E.D.; LADALARDO, T.C.C.G.P. **Atlas de laserterapia aplicada à clínica odontológica**. São Paulo: Ed. Santos, 2003.

BYRNES, K.R.; WAYNANT, R.W.; ILEV, I.K.; WU, X.; BARNA, L.; SMITH, K.; HECKERT, R.; GERST, H.; ANDERS, J.J. Light promotes regeneration and functional recovery and alters the immune response after spinal cord injury. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.36, p.171-185, 2005.

CALLAGHAN, A.; RIORDAN, C.; GILMORE, W.S.; MCINTYRE, I.A.; ALLEN, J.A.; HANNINGAN, B.H. Reactive oxygen species inducible by low-intensity laser radiation parameters. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.19, p.201-206, 1996a.

CALLAGHAN, G.A.; RIORDAN, C.; GILMORE, W.S.; McINTYRE, I.A.; ALLEN, J.M.; HANNIGAN, B.M. Reactive oxygen species inducible by low- intensity laser irradiation after DNA synthesis in the haemopoietic cell line V937. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.19, p.201-206, 1996b.

CALDERHEAD, R.G. Introduction to laser therapy: pathways, mechanisms and dosimetry. In: **2nd Congress World Association for Laser Therapy**, Proceedings... Kansas City, USA, Sep 2-5, 1998, p.7.

CHEN, Y.S.; HSU, S.F.; CHIU, C.W.; LIN, J.G.; CHEN, J.G.; YAO, C.H. Effect of low-power pulsed laser on peripheral nerve regeneration in rats. **Microsurgery**, v.25, p.83-89, 2005.

CHIO, C.H.; LIN, S.H. J.; KAO, M.C.H. Cytogenetic effects of low level laser irradiation of human leukocytes. **Laser Therapy**, v.2, n.3, p.111-117, 1990.

COHEN, N.; LUBART, R.; RUBINSTEIN, H.; BREITBART, H. Light irradiation of mouse spermatozoa: stimulation of *in vitro* fertilization and calcium signals. **Photochemistry and Photobiology**, v.68, p.404-413, 1998.

COLLS, J. La terapia laser, hoy. Barcelona: **Centro Documentación Laser**, p. 39-60, 1986.

CORCORAN, D.; FAIR, T.; PARK, S.; RIZOS, D.; PATEL, O. V.; SMITH, G. W.; COUSSENS, P.M.; IRELAND, J.J.; BOLAND, M.P.; EVANS, A.C.O.; LONERGAN, P. Suppressed expression of genes involved in transcription and translation in *in vitro* compared with *in vivo* cultured bovine embryos. **Reproduction**, v.131, p.651-660, 2006.

DE BIE, R.A.; DE VET., H.; LENSSEN, T.F.; WILDENBERG, F.; KOOTSTRA, G. Low-level laser therapy in ankle sprains: a randomized clinical trial. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v.79, p.1415-1420, 1997.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. **Human Reproduction**, v.10, n.1, p.15-21, 1995.

ECKER, D.J.; STEIN, P.; XU, Z.; WILLIAMS, C.J.; KOPF, G.S.; BIKER, W.B.; ABEL, T.; SCHULTZ, R.M. Long-term effects of culture of preimplantation mouse embryos on behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.101, p.1595-1600, 2004.

EL SAYED, S.O.; DYSON, M. Effect of laser pulse repetition rate and pulse duration on mast cell number and degranulation. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.19, p.433-437, 1996.

FABER, D.C.; MOLINA, J.A.; OHLRICH, D.A.; VANDER ZWAAG, D.F.; FERRÉ, L.B. Commercialization of animal biotechnology. **Theriogenology**, v.59, p.125-138, 2003.

FERNANDEZ-GONZALEZ, R.; MOREIRA, P.; BILBAO, A.; JIMENÉZ, A.; PÉREZ-CRESPO, M.; RAMIREZ, M.A.; DE FONSECA, F.R.; PINTADO, B.; GUTIERREZ-ADÁN, A. Long-term effects of *in vitro* culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.101, p.5880-5885, 2004.

FRASER, L.R. Mechanisms regulating capacitation and the acrosome reaction. In: **Human sperm acrosome reaction**. Mountrouge. John Libbey Eurotext Ltda, 1995, p.17-33.

FUJIMAKI, Y.; SHIMOYAMA, T.; LIU, Q.; UMEDA, T.; NAKAJI, S.; SUGAWARA, K. Low-level laser irradiation attenuates production of reactive oxygen species by human neutrophils. **Journal of Clinical Laser and Medicine and Surgery**, v.21, p.165-170, 2003.

GARDNER, D.K. Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. **Theriogenology**, v.49, p.83-102, 1998.

GARTY, N.; SALOMON, Y. Stimulation of partially purified acenylate cyclase from bull sperm by bicarbonate. **FEBS Letters**, v. 218, p. 148-152, 1987.

GENOVESE, W.J. **Laser de baixa intensidade: aplicações terapêuticas em Odontologia**. São Paulo: Lovise, 2000.

HAMBLIM, M.R.; DEMIDOVA, T.N. Mechanisms of Low Level Light Therapy, **Proceedings of SPIE**, v. 6140, p.614001-1-12, 2006.

HAWKINS, D.; ABRAHAMSE, H. Biological effects of helium-neon laser irradiation on normal and wounded human skin fibroblasts. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.23, p.251-259, 2005.

HE, C.L.; DAMIANI, P.; PARYS, J.B.; FISSORE, R.A. Calcium, calcium release receptors, and meiotic resumption in bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v.57, p.1245-1255, 1997.

HOLM, P., CALLESEN, H. *In vivo* versus *in vitro* produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. **Reproduction, Nutrition, Development**, v.38, p.579-544, 1998.

HOMA, S.T. Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte. **Molecular Reproduction and Development**, v.40, p.122-134, 1995.

HOMA, S.T.; WEBSTER, S.D.; RUSSEL, R.K. Phospholipid turnover and ultrastructural correlates during spontaneous germinal vesicle breakdown of the bovine oocyte: effect of a cyclic AMP phosphodiesterase inhibitor. **Developmental Biology**, v.146, p.461-472, 1991.

IONUE, K.; NISHIOKA, J.; HUKUDA, S. Altered lymphocyte proliferation by low dosage laser irradiation. **Clinical & Experimental Rheumatology**, v.7, p.521-523, 1989.

JANSEN, R.P.; BOER, K. The bottleneck: mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate. **Molecular and Cell Endocrinology**, v. 145, p.81-88, 1998.

KANE, M.T. A review of *in vitro* gamete maturation and embryo culture and potential impact on future animal biotechnology. **Animal Reproduction Science**, v.79, n.3-4, p.171-90, 2003.

KARU, T. I. Biological action of low intensity visible monochromatic light and some of its medical applications. In: GALLETI, G. **Laser**. Bologna, Itália. p.381, 1985.

KARU, T.I. Depression of the genome after irradiation of human lymphocytes with He-Ne laser. **Laser Therapy**, v.4, n.1, p.5-24, 1991.

KARU, T.I. Effects of visible of radiation on cultured cells. **Photochemistry and Photobiology**, v.52, n.6, p. 1089-1098, 1990.

KARU, T.I. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation. **Lasers Life Science**, v.2, p.53-74, 1988.

KARU, T.I. Photobiological fundamentals of low power laser therapy. **IEEE Journal Quantum Electronics**, QE-23, v.10, p.1703-1717, 1987.

KARU, T.I. **Photobiology of low-power laser therapy**. London: Harwood Academic Publishers, 1989.

KARU, T.I. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.49, p.1-17, 1999.

KARU T.I **The science of low power laser therapy**. London: Gordon and Breach Science, 1998.

KARU, T.I. Two different mechanisms of low intensity laser photobiological effects on *Escherichia coli*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.24, n.3, p.155-161, 1994.

KARU. T.I; ANDREICHUK, T.; RYABYKH, T. Changes in oxidative metabolism of murine spleen following diode laser (660-950 nm) irradiation: effect of cellular composition and radiation parameters. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.13, p.453-462, 1993.

KERT, J.; ROSE, L. **Clinical laser therapy: low level laser therapy**. Copenhagen: Scandinavian Medical Laser Technology, 1989, p.140-155.

KHURANA, N.K.; NIEMANN, H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived *in vitro* or *in vivo*. **Biology of Reproduction**, v.62, p.847-856, 2000.

KITCHEN, S.S.; BAZIN, S. **Eletroterapia de Clayton**. São Paulo: Manole, p. 191-210, 1996.

KITCHEN, S.S.; PARTRIDGE, C.J. A review of low level laser therapy. **Physiotherapy**, v.77, n.3, p.161-168, 1991.

KREISLER, M.; CHRISTOFFERS, B.; AL-HAJ, H.; WILLERSHAUSEN, B.; HOEDT, B. Low level 809-nm diode laser-induced *in vitro* stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.30, p.365-369, 2002.

KRISHER, R.L. The effect of oocyte quality on development. **Journal of Animal Science**, v.82, p. E14-E23, 2004.

KRUIP, T.A.M.; DENDAAS, J.H.G. *In vitro* produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition and offspring. **Theriogenology**, v.47, p.43-52, 1997.

KUBOTA, T.; KADOKURA, A.; SARAGURI, K.; SHIRATORI, J.; SUZUKI, Y.; KASHIMO, I.; TAKANO, M. Computer cephalography using laser scan system. **The Bulletin of the Kanagawa Dental College**, v.17, n.2, p.103-112, 1989.

KUBOTA, J.; OHSHIRO, T. The effects of diodo laser low reactive level laser therapy (LLLT) on flap survival in rat model. **Laser Therapy**, v.1, n.3, p.127, 1989.

KUSAKARI, H.; ORIKASA, N.; TANI, H. Effects of low power laser on wound healing on gingival and bone. In: **WORLD CONGRESS INTERNATIONAL SOCIETY FOR LOW POWER LASER APPLICATION IN MEDICINE**. Annals... Bologna, Itália, 1992, p.49-55.

LAZZARI, G.; WRENZYCKI, C.; HERMANN, D.; DUCHI, R.; KRUIP, T.; NIEMANN, H.; GALLI, C. Cellular and molecular deviations in bovine *in vitro*-produced embryos are related to the large offspring syndrome. **Biology of Reproduction**, v.67, p.767-775, 2002.

LIEVENS, P.C. The effect of I.R Laser treatment on the regeneration of the lymphatic system and wound healing. **Laser News**. v.6, p.189-191, 1991.

LOEVSCHELL, H.; ARENHOLT-BINDSLEV, D. Effects of low level diode laser irradiation of human oral mucous fibroblasts *in vitro*. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.14, p.347-354, 1994.

LONERGAN, P.; FAIR, T.; CORCORAN, D.; EVANS, A.C.O. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**, v.65, p.137-152, 2006.

LOPES-MARTINS, R.A.; ALBERTINI, R.; MARTINS, P.S.; BJORDAL, J.M.; FARIA NETO, H.C. Spontaneous effects of low-level laser therapy (650 nm) in acute inflammatory mouse pleurisy induced by Carrageenan. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.23, p.377-381, 2005.

LO TURCO, E.G. **Maturação nuclear e padrões de apoptose em oócitos bovinos na presença de células do cumulus em meio suplementado com diversas fontes de macromoléculas**. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

LOW, L.; REED, A. **Eletroterapia explicada: Princípios e Prática**. Barueri: Manole, 2001.

LUBART, R.; FRIEDMANN, H.; LEVINSHAL, T.; LAVIE, R.; BREITBART, H. Effect of light on calcium transport in bull sperm cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 15, p.337-41, 1992.

LUBART, R.; WOLLMAN, Y.; FRIEDMANN, H.; ROCHKIND, S.; LAULICHT, I. Effects of visible and near infrared lasers on cell cultures. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v.12, p.305-310, 1992.

MAIMAN, T.H. Stimulated optical radiation in ruby. **Nature**, v.187, p.493, 1960.

MAILER, K. Superoxidative radical as electrón donor for oxidative phosphorylation of ADP. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.70, n.1, p.59-64, 1990.

MARIN, M.L., VÉLEZ, J.L. **Efectos de la irradiación laser helio-neon en semen bovino**. Tese (Doutorado) – Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de Medellin, Universidad de Antioquia, Medellin, 1980.

MELLO, J.B.; MELLO, G.P.S. **Laser em Odontologia**. São Paulo: Santos, 2001.

MESTER, E. A laser sugar alkamazaea a gyogyaezatban. **Orvosi Hetilap**, v.107, p.1012, 1966.

MESTER, E. Experimentation on the interaction between infrared laser and wound healing. **Exper. Chirurg.**, v.2, p.94, 1969.

MICHAELS, G.S.; HAUSWIRTH, W.W.; LAIPIS, P.J. Mitochondrial DNA copy number in bovine oocytes and somatic cells. **Developmental Biology**, v.94, p.246-251, 1982.

MILORO, M.; HALKIAS, L.E.; MALLERY, S.; Travers, S.; Rashid, R.G. Low-level laser effect on neural regeneration in Gore-Tex tubes. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics**, v.93, p.27-34, 2002.

MOORE, P.; RIDGWAY, T.D.; HIGBEE, R.G.; HOWARD, E.W.; LUCROY, M.D. Effect of wavelength on lowintensity laser irradiation-stimulated cell proliferation *in vitro*. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.36, p.8-12, 2005.

MOROZ, A.M. Na⁺, K⁺-ATPase activity in erythrocytes after the effect of laser radiation. **Ukrainskii Biokhimičeskii Zhurnal**, v.55, n.6, p.674-676, 1983.

NAVRATIL, L.; DYLEVSKY, I. Mechanisms of biostimulation effects of therapeutic laser *in vivo*. **Sbornik Lekarsky**, v.57, n.4, p.521-527, 1996.

NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequent development. **Theriogenology**, v.53, p.21-34, 2000.

NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C.; LUCAS-HAHN, A.; BRAMBRINK, T.; KUES, W.A.; CARNWATH, J.W. Gene expression patterns in bovine *in vitro*-produced and nuclear transfer-derived embryos and their implications for early development. **Cloning Stem Cells**. v.4, n.1, p.29-38, 2002.

NUSSBAUM, E.L.; LILGE, L.; MAZZULLI, T.J. Effects of low-level laser therapy (LLLT) of 810 nm upon *in vitro* growth of bacteria: relevance of irradiance and radiant exposure. **Journal of Clinical Laser and Medicine & Surgery**, v.21, n.5, p.283-290, 2003.

OCAÑA-QUERO, J.M.; GOMEZ-VILLAMANDOS, R.; MORENO-MILLAN, M.; SANTISTEBAN-VALENZOELA, J.M. Biological effects of Helium-Neon (He-Ne) laser irradiation on acrosome reaction in bull sperm cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.40, p.294-298, 1997.

OCAÑA-QUERO, J.M.; GOMEZ-VILLAMANDOS, R.; MORENO-MILLAN, M.; SANTISTEBAN-VALENZOELA, J.M. Helium-Neon (He-Ne) laser irradiation increases the incidents of unreduced bovine oocytes during the first meiotic division *in vitro*. **Lasers in Medical Science**, v.13, p.260-264, 1998.

OHTA, A.; ABERGEL, R.P.; UITTO, J. Laser modulation of human immune system: Inhibition of lymphocyte proliferation by a Gallium-Arsenide laser at low energy. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.7, p.199-201, 1987.

OLIVEIRA, A.T.D.; LOPES, R.F.F.; RODRIGUES, J.L. Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced *in vitro* under varying embryo density conditions. **Theriogenology**, v.64, p.1559-1572, 2005.

OSHIRO, T. **Low reactive-level laser therapy practical application**. Chichester: John Wiley & Sons, p.3-10, 1991.

O'TOOLE, C.M.B.; ARNOULT, C.; DARSON, A.; STEINHARDT, R.A.; FLORMAN, H.M. Ca^{2+} entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. **Molecular Biology of the Cell**, v.11, p.1571-1584, 2000.

OZAWA, Y.; CHIMIZU, N.; KARIYA, G.; ABIKO, Y. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. **Bone**, v.22, n.4, p.347-354, 1998.

OZIL, P. Production of identical twins by bisection of blastocysts in the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.69, n.2, p.463-468, 1983.

PALMGREN, N. Low-power laser therapy in rheumatoid arthritis. **Lasers in Medical Science**, v.12, p.441, 1992.

PARRISH, J.A.; ROSEN, C.F.; GANGE, R.W. Therapeutic uses of light. **Annals New York Academy of Sciences**, v.453, p.354-364, 1985.

PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; GRAHAM, J.K. *In vitro* capacitation of bovine spermatozoa: role of intracellular calcium. **Theriogenology**, v.51, p.461-472, 1999.

PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; UGUZ, C.; FIRST, N.L. Differences in the role of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid. **Biology of Reproduction**, v.51, p.1099-1108, 1994.

PASSARELLA, S.; CASAMASSIMA, F.; MOLINARI, S.; PASTORE, D.; QUAGLIARIELLO, E.; CATALANO, I.M.; CINGOLANI, A. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated *in vitro* by He-Ne laser. **FEBS Letters**, v.175, p.95-99, 1984.

PÉCORA, J. D.; BRUGNERA JÚNIOR, A. **Noções sobre a Física do Laser**, 1999, disponível no site: <http://www.forp.usp.br/restauradora/laser/fisica.html>, acessado em 15 de Dezembro de 2007.

PEIXER, M.A.S.; DODE, M.A.N., RUMPF, R. Produção *in vitro* de embriões - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. **Arquivos da Faculdade de Veterinária – UFRGS**, Porto Alegre, v.28, n.1, p.175-178, 2000.

PEREIRA, A.N.; EDUARDO, C.P.; MATSON, E.; MARQUES, M.M. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.31, p.263-267, 2002.

PEREZ, G.I.; TRBOVICH, A.M.; GOSDEN, R.G.; TILLY, J.L. Mitochondria and the death of oocytes. **Nature**, v.403, p.500-501, 2000.

PORTER, M. Photon Therapy. In: **The new equine sports therapy**. Lexington: The Blood Horse, 1998a. p.2.

PORTER, M. Photon Therapy. In: **The new equine sports therapy**. Lexington: BloodHorse, Lexington, 1998b, p.153-184.

POURREAU-SCHNEIDER, N.; SOUNDRY, M.; REMUSAT, M.; FRARQUIN, J.C.; MARTIN, P.M. Modifications of growth dynamics and ultrastructure after helium-neon laser treatment of human gingival fibroblasts. **Quintessence International**, v. 20, n.12, p.887-893, 1989.

PRINCETON UNIVERSITY. Enviromental Health & Safety. **Section 1: Laser Fundamentals**, [On line], disponível em <<http://web.princeton.edu/sites/ehs/laserguide/index.htm>>, acessado em 28 de novembro de 2007.

RENNO, A.C.M.; MCDONNELL, P.A.; PARIZOTTO, N.A.; LAAKSO, E.-L. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation *in vitro*. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.25, n.4, p.275-280.

REYNIER, P.; MAY-PANLOUP, P.; CHRETIEN, M.F.; MORGAN, C.J.; JEAN, M.; SAVAGNER, F.; BARRIERE, P.; MALTHIERY, Y. Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. **Molecular Human Reproduction**, v.7, p.425-429, 2001.

RIBEIRO, M. S.; SILVA, D. F. T. da; ARAÚJO, C. E. N de; OLIVEIRA, S. F. de; PELEGRINI, C. M. R.; ZORN, T. M. T.; ZECELL, D. M. Effects of low-intensity polarized visible laser radiation on skin burns: a light microscopy study. **Journal of Clinical Laser and Medicine & Surgery**, v.22, n.59-66, 2004.

RIEDMANN, H.; LUBART, R.; LAUCHIT, I.; ROCHKIND, S. A possible explanaytion laser-induced stimulation and damage of cell cultures. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.11, n.1, p. 87-91, 1991.

RIEGER, D. Relationship between energy metabolism and development of early mammalian embryos. **Theriogenology**, v.37, p.75-93, 1992.

RIGAU, J. **Acción de la luz laser a baja intensidad em la modulación de la función celular**, Tese (Doutorado em Histologia) – Facultad de Medicina i Ciència de la Salut. Univ. Rovira i Virgili, Réus, 1996.

RIZOS, D.; LONERGAN, P.; BOLAND, M.P.; ARROYO-GARCÍA, R.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. **Biology of Reproduction**, v.66, p.589-595, 2002a.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization and early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implication for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, v.61, p.234-248, 2002b.

ROCHKIND, S.; ROUSSO, M.; NISSAN, M.; VILLAREAL, M.; BARR-NEA, L.; REES, D. G. Systemic effects of Low-Power Laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds, and burns. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.9, p.174-182, 1989.

SANTELLA, L.; DE RISO, L.; GRAGNANIELLO, G.; KYOZUKA, K. Cortical granule translocation during maturation of starfish oocytes requires cytoskeletal rearrangement triggered by InsP3-mediated Ca²⁺ release. **Experimental Cell Research**, v.248, p.567-574, 1999.

SASAKI, K.; OHSHIRO, T. Role of Low Reactive-Level Laser Therapy (LLLTL) in the treatment of acquired and cicatricial vitiligo. **Laser Therapy**, v.1, n.3, p.141-144, 1989.

SCHAFFER, M.; SROKA, R.; SCHRADER-REICHARDT, U.; SCHAFFER, P.M. Biomodulative effects induced by 805 nm laser light irradiation of normal and tumor cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.40, p.253-257, 1997.

SCHULTZ, R.J.; KRISHNAMURTHY, S.; TELMO, W.; RODRÍGUEZ, J.E.; HARVEY, G. Effects of varying intensities of laser energy on articular cartilage. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.5, p.557-88, 1985.

SCHWARTZ, F.; BRODIE, C.; APPEL, E.; KAZIMIRSKY, G.; SHAINBERG, A. Effect of helium/neon laser irradiation on nerve growth factor synthesis and

secretion in skeletal muscle cultures. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.66, n.3, p.195-200, 2002.

SIPOSAN, D.G.; LUKACS, A. Effect of low-level laser radiation on some rheological factors in human blood: an *in vitro* study. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**. v.18, n. 4, p.185-195, 2000.

STEIN, A.; BENAYAHU, D.; MALTZ, L.; ORON, U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts *in vitro*. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.23, n. 2, p.161-166, 2005.

STEUERWALD, N.; BARRIT, J.A.; ADLER, R.; MALTER, H.; SCHIMMEL, T.; COHEN, J.; BRENNER, C.A. Quantification of mtDNA in single oocytes, polar bodies and subcellular components by real-time rapid cycle fluorescence monitored PCR. **Zygote**, v.8, p.209-215, 2000.

STOREY, B.T. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v.3, n.3, p..203-213, 1997.

STRONG, L.H.; BERTHIAUME, F.; YARMUSH, M.L. Control of fibroblast populated collagen lattice contraction by antibody targeted photolysis of fibroblasts. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.21, p.235-247, 1997.

SVAASAND, L.O. Physical and biological aspects of laser light. **Tidsskr Nor Laegeforen**, v.111, n.21, p. 2646-2650, 1991.

TAKAC, S.; STOJANOVIC, S. Characteristics of laser light. **Medicinsk Pregled**, v.52, n.1-2, p. 29-34, 1999.

TESFAYE, D.; PONSUKSILI, S.; WIMMERS, K.; GILLES, M.; SHCELLANDER, K. A comparative expression analysis of gene transcripts in post-fertilization developmental stages of bovine embryos produced *in vitro* or *in vivo*. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, p.396-404, 2004.

TORRICELLI, P.; Giavaresi, G.; Fini, M.; Guzzardella, G. A.; Morrone, G.; Carpi, A.; Giardino, R. Laser biostimulation of cartilage: *in vitro* evaluation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.55, n.2, p.117-120, 2001.

TOSTI, E.; BONI, R.; CUOMO, A. Fertilization and activation currents in bovine oocytes. **Reproduction**, v.124, p.835-846, 2002.

TRELLES, M.A.; MAYAYO, E.; MIRÓ, L.; RIGAU, J.; BAUDIN, G.; LAPIN, R. Histamine and low power laser. **Journal of Bloodless Medicine and Surgery**, v.6, n.1, p.15-16, 1988.

TRELLES, M.A.; MAYAYO, E.; MIRÓ, L.; RIGAU, J.; BAUDIN, G.; CAUDERHEAD, R.G. The action of low reactive level laser therapy (LLLT) on Mast Cells: a possible pain relief mechanism examined. **Laser Therapy**, v.1, n.1, p.27-30, 1989.

TUNER, J.; HODE, L. **Laser therapy in dentistry and medicine**. Stockholm: Prima Books, 1996.

TUNER, J.; HODE, L. **Low level laser therapy. Clinical practice and scientific background**. Sweden: Prima Books, 1999.

UGUZ, C.; VREDENBURGH, W.L.; PARRISH, J.J. Heparin-induced capacitation but not intracellular alkalization of bovine sperm is inhibited by Rp-Adenosine-3'5'-cyclic monophosphorothioate. **Biology of Reproduction**, v.51, p.1031-1039, 1994.

VAN BLERKOM, J.; SINCLAIR, P. Mitochondrial transfer between oocytes: potential applications of mitochondrial donation and the issue of heteroplasmy. **Human Reproduction**, v.13, p.2857-2868, 1998.

VAN BREUGEL, H.N.; BAR, P.R. Power density and exposure time of He-Ne laser irradiation are more important than total energy dosis in photo-biomodulation of human fibroblasts *in vitro*. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.12, n.5, p. 528-537, 1992.

VÉLEZ-GONZÁLEZ, M.; URREA-ARBELÁEZ, A.; NICOLAS, M.; SERRA-BALDRICH, E.; PEREZ, J. L.; PAVESTI, M.; CAMARASA, J. M.G.; TRELLES, M. A. Treatment of relapse in Herpes simplex on labial & facial areas and of primary herpes simplex on genital areas and area pudenda with low power laser (He-Ne) or acyclovir administred orally. In: **The International Society for Optical Engineering**. Proceedings... p. 43-48, 1994.

VISCONTI, P.E.; KOPF, G.S. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v.659, p.1-6, 1998.

VISCONTI P.E.; MUSCHIETTI, J.P.; FLAWIA, M.M.; TEZON, J.G. Bicarbonate dependence of cAMP accumulation induced by phorbol esters in hamster spermatozoa. **Biochimica et Biophysica ACTA**, v.1054, p.231-236, 1990.

VISCONTI P.E.; STEWART-SAVAGE, J.; BLASCO, A.; BATTAGLIA, L.; MIRANDA, P.; KOPF, G.S.; TEZON, J.G. Roles of bicarbonate, cAMP, and

tyrosine phosphorylation on capacitation and the spontaneous acrosome reaction of hamster sperm. **Biology of Reproduction**, v. 61, p.76-84, 1999.

VISCOR, G.; PALACIOS, L.; PALOMEQUE, J. Effect of He-Ne laser irradiation of blood *in vitro* on erythrocyte microrheological properties. **Lasers Life Science**, v.3, n.1, p.31-36, 1989.

VOLPI, N.; VENTURELLI, T.; ZIRILLI, O.; BOLOGNANI, L. Adenylate pool and energy change in human lymphocytes and granulocytes irradiated at 632 nm (HeNe laser). **Laser Technology**, v.5, n.1-2, p.19-23, 1995.

WEBB, C.; DYSON, M.; LEWIS, W.H. Stimulatory effect of 660 nm low level laser energy on hypertrophic scar derived fibroblasts: possible mechanism of increase in cell counts. **Lasers in Surgery and Medicine**

WRENZYCKI, C.; HERMANN, D.; LUCAS-HAHN, A.; KORSawe, K.; LEMME, E.; NIEMANN, H. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from *in vitro* procedures and their implications for development. **Reproduction, Fertility and Development**, v.17, p.23-35, 2005.

YAMAMOTO, M.; TAMURA, K.; HIRATSUKA, K.; ABIKO, Y. Stimulation of MCM3 gene expression in osteoblast by low level laser irradiation. **Lasers Med. Sci.**, v.16, p.213-217, 2001.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: **Physiology of Reproduction**. New York: Raven, 1994, p.189-317.

YOUNG, S.; BOLTON, P.; DYSON, M.; HARVEY, W.; DIAMANTOPOULOS, C. Macrophage responsiveness to light therapy. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.9, p.497-505, 1989.

YU, H.S.; WU, C.S.; YU, C.L.; KAO, Y.K.; CHIOU, M.K. Helium-neon laser irradiation stimulates migration and proliferation in melanocytes and induces repigmentation in segmental-type vitiligo. **Journal of Investigative Dermatology**, v.120, p.56-64, 2003.

ZENG, Y.; CLARK, E.N.; FLORMAN, H.M. Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucid-dependent acrosomal secretions. **Developmental Biology**, v.61, n.2, p.554-563, 1995.

ZENG, Y.; OBERDORF, J.A.; FLORMAN, H.M. pH regulation in mouse sperm: identification of Na⁺, Cl⁻, and HCO₃⁻ dependent and arylaminobenzoate-dependent

regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation. **Developmental Biology**, v.173, n.2, p.510-520, 1996.

ZHANG, Y.; SONG, S.; FONG, C.C.; TSANG, C.H.; YANG, Z.; YANG, M. cDNA microarray analysis of gene expression profiles in human fibroblast cells irradiated with red light. **Journal of Investigative Dermatology**, v.120, p. 849-857, 2003.

CAPÍTULO 2 – EFEITOS DA IRRADIAÇÃO COM LASERS DE BAIXA POTÊNCIA NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS

Título

Efeitos da Irradiação com Lasers de Baixa Potência na Maturação *In Vitro* de Oócitos Bovinos

Resumo

RESUMO – A ocorrência da maturação oocitária eficiente depende de eventos nucleares e citoplasmáticos. O estado energético dos oócitos, estimado pela quantidade de ATP, é um fator crítico para que eles aconteçam. Acredita-se que a irradiação com laser de baixa potência sobre as células ative o transporte de elétrons da cadeia respiratória, resultando em um aumento dos níveis de ATP mitocondrial. O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos da irradiação com lasers infravermelho e visível-vermelho na maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos. Oócitos foram coletados a partir de ovários de vacas em abatedouro, selecionados e tratados com quatro tempos de irradiação (30 segundos – L30; 60 segundos – L60; 120 segundos – L120; 180 segundos – L180) para cada tipo de laser, separadamente. Em seguida foram destinados à MIV durante 24 horas em atmosfera úmida a 38,5°C e 5% de CO₂. A maturação nuclear foi avaliada por meio da visualização da placa metafásica e da extrusão do primeiro corpúsculo polar, e a citoplasmática por meio da distribuição dos grânulos corticais. A irradiação com ambos os lasers não afetou as taxas de maturação nuclear (Infravermelho: L30 - 88,92% e C30 – 81,84%; L60 – 83,56% e C60 – 87,40%; L120 – 76,06% e C120 – 85,30%; L180 – 77,42% e C180 - 80,16%; e Visível: L30 – 65,81% e C30 – 71,59%; L60 – 62,75% e C60 – 69,62%; L120 – 70,38% e C120 – 64,04%; L180 – 56,72% e C180 – 67,41%). Do mesmo modo, as taxas de maturação citoplasmática não foram alteradas após a irradiação (Infravermelho:

L30 – 86,18% e C30 – 61,04%; L60 – 66,03% e C60 – 56,16%; L120 – 53,75% e C120 – 79,81%; L180 – 57,70% e C180 – 82,04% e Visível: L30 – 81,08% e C30 – 74,42%; L60 – 68,11% e C60 – 61,63%; L120 – 75,95% e C120 – 48,33%; L180 – 77,77% e C180 – 59,52%). A produção de blastocistos ao sétimo dia de cultivo *in vitro* foi avaliada, não sendo observadas diferenças entre os grupos controle e tratados com o laser infravermelho (L30 – 29,20% e C30 – 42,60%; L60 – 32,0% e C60 – 31,0%; L120 – 38,0% e C120 – 35,0%; L180 – 37,0% e C180 – 32,0%), mas foram notadas no grupo tratado com laser visível durante 180 segundos (L180 – 36,0%) em relação ao grupo controle (C180 – 56,0 %). Os grupos tratados com laser visível durante 30, 60 e 120 segundos não mostraram diferenças significativas na produção embrionária (L30 – 42,20%; L60 – 40,13%; L120 – 39,54%) em relação aos grupos controle (C30 – 43,36%; C60 – 38,16%; C120 – 47,14%). Assim, as irradiações com os lasers infravermelho e visível em oócitos bovinos durante 30, 60, 120 e 180 segundos, aplicadas imediatamente anterior à sua maturação *in vitro*, não alteraram os processos de maturação nuclear e de migração de grânulos corticais. A irradiação com laser infravermelho em oócitos não alterou as taxas de produção embrionária ao sétimo dia de cultivo *in vitro*, mas a irradiação com laser visível, quando aplicada em oócitos durante 180 segundos, reduziu a produção de embriões no grupo tratado em relação ao grupo controle.

Palavras-Chave: Oócito bovino, Maturação *in vitro*, Laser de baixa potência

1. Introdução

A técnica de produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos tem sido utilizada com sucesso desde meados da década de 80, quando BRACKETT et al. (1982) provou ser possível a obtenção de bezerro vivo a partir de oócitos maturados e fertilizados *in vitro* (MIV e FIV, respectivamente). Apesar de quase três décadas de aplicação crescente dessa biotecnologia na espécie bovina, limitações ainda persistem e são refletidas nos baixos resultados obtidos sobre a taxa e qualidade de mórulas e blastocistos, além das baixas taxas de gestações e nascimentos

(LEEuw, 2006). O procedimento da PIV é basicamente composto por três etapas: a de MIV, FIV e CIV (cultivo *in vitro*) e ainda que todas elas sejam importantes, o estabelecimento de uma maturação eficiente é, sem dúvida, um ponto crucial e decisivo para as etapas seguintes. Apesar do conhecimento sobre o processo de maturação oocitária *in vitro* ter avançado substancialmente, vários de seus aspectos ainda estão por serem esclarecidos.

2. Revisão de literatura

2.1 Oogênese e maturação nuclear

Em bovinos, assim como na maioria dos mamíferos, o desenvolvimento do gameta feminino (oogênese) tem início ainda na vida fetal da fêmea, quando células germinativas (oogônias) sofrem mitose e posteriormente iniciam seu processo de meiose, progredindo até a fase de Leptóteno da Prófase da primeira divisão meiótica (Prófase I). Nesta fase, conhecida como primeiro bloqueio meiótico, o oócito organiza seu núcleo em vesícula germinativa (GV) e interrompe a meiose. Do período que se estende do nascimento até a puberdade, os oócitos permanecem com seus núcleos estagnados, mas a partir do início da mesma, a circulação crescente de hormônios gonadotróficos e esteróides permite o crescimento de folículos e o desenvolvimento dos oócitos localizados em seu interior. Posteriormente, há uma fase de divergência folicular, em que apenas um folículo, conhecido como folículo dominante continua seu crescimento tornando-se maior e os demais folículos cessam seu crescimento e regridem por atresia (MÉONICIURA, 2005). Algumas horas antes da ovulação, o pico de hormônio luteinizante (LH) induz o crescimento final do folículo e o desenvolvimento final de seu oócito (HYTELL et al., 1997). O gameta que até então se encontrava no estágio de VG da Prófase I reinicia a meiose e passa para o estágio de metáfase da segunda divisão meiótica (MII). O período de reinício da meiose até o término da primeira divisão meiótica, quando o oócito permanece em MII, constitui o processo de maturação nuclear. Neste momento o oócito pode ser fecundado e

completar a meiose II, mas caso isso não aconteça, ele se degenera entre 28-32 horas após a ovulação (MÉO-NICIURA, 2005).

No entanto, o processo global de maturação do oócito não se restringe somente a uma competência meiótica nuclear, sendo necessária também a maturação do citoplasma da célula. Quando a maturação nuclear e/ou a citoplasmática acontece de forma incompleta ou desincronizada, os processos que se seguem tornam-se comprometidos, podendo levar desde a morte do oócito ou a sua não fertilização, até a morte prematura do zigoto ou o bloqueio do desenvolvimento embrionário posteriormente (MÉO-NICIURA, 2005).

2.2 Maturação citoplasmática

A maturação do citoplasma do oócito é coordenada por eventos morfológicos, moleculares e bioquímicos que, sendo bem sucedidos, fornecem ao oócito condições para o desenvolvimento posterior. É nessa fase que ele expande seu tamanho, acumula RNA mensageiro (RNAm) e energia, além de redistribuir e aumentar o número de suas organelas, sincronizando esses processos com o reinício da meiose (HYTTEL et al., 1997). Falhas na maturação citoplasmática são consideradas como um dos principais responsáveis pelo menor número de blastocistos produzidos *in vitro* em relação aos *in vivo*, visto que a maturação nuclear, as taxas de fecundação e a clivagem de oócitos maturados em ambos não diferem significativamente (LEIBFRIED - RUTLEDGE et al., 1987; RIZOS et al., 2002).

Após um longo período de quiescência, o oócito recebe sinais para retomar seu desenvolvimento. Além de seu crescimento expansivo, ocorre um conjunto de modificações na disposição e no número de suas organelas intracelulares (PICTON et al., 1998). A grande maioria, que antes se encontrava na periferia do citoplasma, migra em direção ao núcleo, como é o caso das mitocôndrias, do retículo endoplasmático rugoso e de um pequeno volume do complexo de Golgi (VAN WEZEL & RODGERS, 1996), que passa a secretar proteínas da zona pelúcida e grânulos corticais, que posteriormente contribuirão para a efetivação da

reação acrossomal e o bloqueio da polispermia, respectivamente (HYTELL et al., 1997). Ao contrário da maioria das organelas, os grânulos corticais se distanciam da sua posição central original e se deslocam na direção da membrana citoplasmática, posicionando-se para liberar substâncias enrijecedoras da zona pelúcida (MÉO-NICIURA, 2005). Paralelamente, ocorre um grande aumento na transcrição de RNAm e produção de proteínas, no número de ribossomos, mitocôndrias e outras organelas, bem como um grande acúmulo de grânulos de glicogênio e gotas lipídicas (FAIR et al., 1996; SIRARD et al., 2006).

Particularmente em relação às mitocôndrias, sua organização e atividade metabólica são necessárias não só para a maturação citoplasmática, mas também para a finalização da meiose (STOJKOVIC et al., 2001).

2.3 Laser de baixa potência sobre os diferentes aspectos da maturação oocitária

2.3.1 Mitocôndrias e fosforilação oxidativa

As mitocôndrias são organelas presentes nas células eucarióticas e contribuem com diversos mecanismos sinalizadores e processos intracelulares, dentre eles, o processo de fosforilação oxidativa (OXPHOS), que acontece na etapa final da respiração celular. Morfologicamente são compostas por uma dupla membrana lipoprotéica constituída da membrana externa e interna, sendo que a primeira permite a passagem livre de moléculas, enquanto que a segunda é mais seletiva, permitindo somente a passagem de substâncias através de transportadores específicos e se desdobra para o interior formando cristas, delimitando o espaço chamado de matriz mitocondrial.

Na membrana mitocondrial interna (MMI) localiza-se o sistema de OXPHOS, constituído por complexos enzimáticos enumerados de I a V e dois carregadores de elétrons, a coenzima-Q e a citocromo c (SMEITINK, 2006), que juntos catalisam uma seqüência de reações de óxido-redução, fazendo com que

elétrons sejam transferidos de um complexo enzimático até o seguinte, sucessivamente, até atingir o oxigênio (O_2) que é reduzido à água (H_2O).

Moléculas de piruvato, produzidas pela glicólise, adentram a matriz mitocondrial e nela sofrem oxidação, gerando íons de hidrogênio (H^+), os quais se unem aos transportadores NAD e NADP (nucleotídeos de nicotinamina), formando NADH e NADPH, respectivamente. No complexo I (ubiquinona oxidoreductase), localizado na MMI, o NADH é desidrogenado e seus elétrons transportados para a coenzima-Q. O complexo II (succinato: ubiquinona oxireductase), por sua vez, catalisa a oxidação do succinato para fumarato, durante a transferência de elétrons do transportador $FADH_2$ (nucleotídeo de flavina acrescido de íons H^+) para o reservatório de ubiquinona. O complexo III (decilubiquinol: citocromo c oxidase) catalisa a transferência de elétrons do ubiquinol para citocromo c e esta, em sua forma reduzida, transfere seus elétrons para o complexo IV (citocromo oxidase), que finalmente reduz o O_2 à H_2O . O transporte de elétrons de um complexo ao outro gera energia que aciona a bomba de prótons H^+ e direciona o fluxo de prótons da matriz em direção ao espaço intermembranas. Por ser impermeável, a MMI impede o retorno dos prótons, sendo necessária a formação de um canal pelo complexo V (ATP Sintetase), através do qual os prótons voltam para a matriz (VAN DEN HEUVEL, 2001) (Figura 4). A energia liberada por eles é então utilizada para a fosforilação propriamente dita com a união de uma molécula de ADP (adenosina di-fosfato) a um P, gerando o ATP (adenosina tri-fosfato).

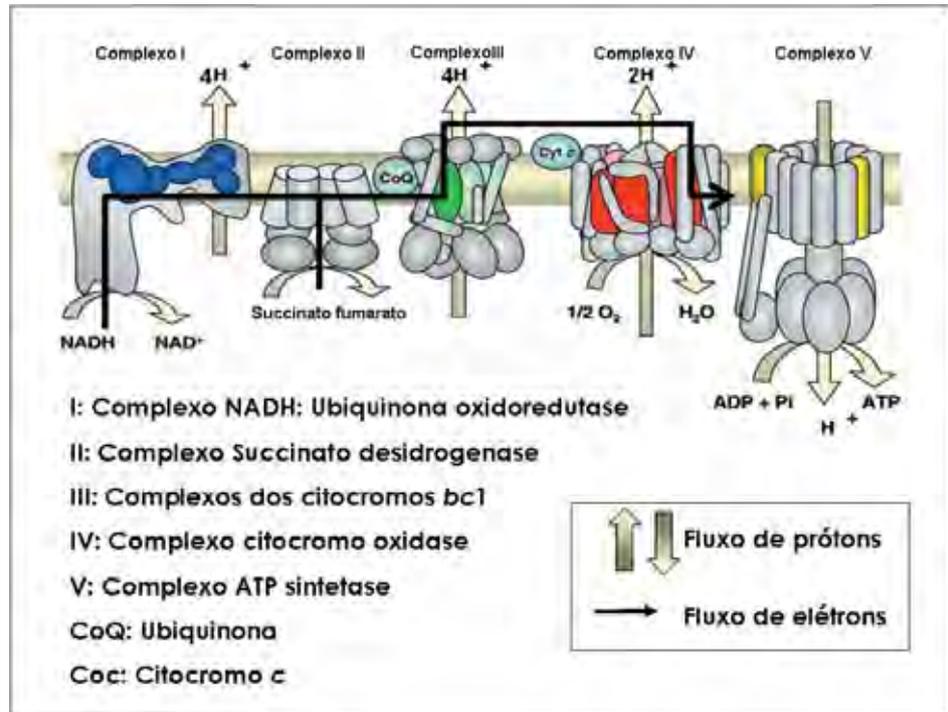


Figura 4. Esquema representativo do processo de OXPHOS. O transporte de elétrons consiste de quatro complexos enzimáticos dispostos na membrana mitocondrial interna, e a passagem por estes, libera energia na forma de gradiente de prótons, utilizada pelo complexo V chamado de ATP sintetase para produzir ATP. No complexo I ocorre a desidrogenação do NADH e transporte de elétrons para a coenzima Q. O transporte de elétrons é acoplado com o deslocamento de prótons para a membrana mitocondrial interna. O complexo II catalisa a oxidação do succinato para fumarato, durante o transporte de elétrons de FADH_2 para o reservatório de ubiquinona; complexo III catalisa a transferência de elétrons do ubiquinol para citocromo c acoplado ao deslocamento de prótons para a membrana mitocondrial interna. O complexo IV está acoplado com a transferência de elétrons da redução do citocromo c para o oxigênio, levando a um deslocamento de prótons pela membrana mitocondrial interna, criando um gradiente utilizado para a síntese de ATP no complexo V. (adaptado de MESQUITA, 2005).

O estado energético dos oócitos, estimado pela quantidade de ATP, é um fator crítico para a sua maturação e é tido como um indicador para o potencial de desenvolvimento de oócitos humanos e de camundongos (STOJKOVIC, 2001). Estudos relataram que a quantidade de mitocôndrias no oócito afeta sua habilidade em produzir ATP (VAN BLERKOM et al., 1998), em escapar da atresia

(PEREZ et al., 2000) e a suportar o desenvolvimento do embrião (REYNIER et al., 2001), verificados principalmente pelo aumento do número de mitocôndrias durante o processo de maturação oocitária (JANSEN & BOER, 1998).

Como já hipotetizado em diversas células, acredita-se que o laser visível e infravermelho próximo ativem o transporte de elétrons da cadeia respiratória (BOSSINI, 2007), resultando em um aumento dos níveis de ATP mitocondrial. Sua radiação é absorvida por cromóforos, ou seja, por um grupo de moléculas que podem ser enzimas, membranas ou qualquer outra substância capaz de absorver luz (KARU, 1998), os quais convertem a energia eletromagnética recebida em energia fotoquímica (ORTIZ et al., 2001).

Estudos utilizando radiações entre 630 e 830 nm demonstraram um aumento nos níveis de ATP em linfócitos humanos (HERBERT et al., 1989) e células HeLa (KARU et al., 1995). NEDELINA et al. (1985) utilizaram radiações com luzes visíveis (≥ 400 nm) e obtiveram um aumento na atividade de ATP-sintetase. Em linfócitos humanos, a radiação com laser He-Ne promove alterações ultra estruturais nas mitocôndrias, tornando-as gigantes, fato interpretado como uma intensificação da energia metabólica (BAKEEVA et al., 1993).

2.3.2. Geração de Espécies Reativas do Oxigênio (EROs)

As Espécies Reativas do Oxigênio (EROs) são produtos do metabolismo aeróbico, sendo o processo de fosforilação oxidativa uma das principais fontes endógenas de sua produção, além da tensão de oxigênio, da concentração de íons metálicos, da intensidade de luz visível, dentre outros, que contribuem exogenamente para sua produção. Tais compostos são formados fisiologicamente durante as etapas intermediárias do processo de redução do oxigênio. O fato de possuírem número ímpar de elétrons faz delas moléculas instáveis, de vida curta e para alcançar sua estabilidade, reagem com substâncias do meio (SILVA, 2006). O radical ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^-), são gerados respectivamente pela redução por um, dois ou três elétrons (GUÉRIN et al., 2001). Quando a cadeia respiratória é interrompida, os

elétrons se acumulam nas fases iniciais do processo e podem ser doados diretamente para o oxigênio molecular para gerar O_2^- . O ânion superóxido é desintoxicado formando o H_2O_2 , que na presença de metais de transição como o ferro e o cobre podem gerar o OH^- .

De acordo com o local de produção e a tensão de oxigênio, várias EROS são geradas (BLONDIN et al., 1997), sendo necessário um equilíbrio em sua concentração, pois caso a sua produção exceda sua neutralização, efeitos tóxicos passam a ser observados. Essas moléculas podem alcançar o citoplasma das células e peroxidar lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, gerando conseqüências múltiplas, como alterações mitocondriais, bloqueio na replicação celular, depleção de ATP e apoptose (GUÉRIN et al., 2001). Por esta razão, as células são protegidas por mecanismos de defesa, chamados antioxidantes, que neutralizam as EROs e seus efeitos

Em oócitos, as EROs podem exercer efeitos deletérios ou benéficos que estendam suas conseqüências desde a maturação até o desenvolvimento embrionário posterior. DAS et al. (2006) constataram que altos níveis de EROs mensurados no fluido folicular de mulheres com infertilidade tubárica tenderam a uma diminuição no potencial de fertilização dos oócitos. Já em coelhos, os efeitos benéficos das EROs foram notados, ao reduzirem o número de grandes folículos em processos ovulatórios (MIYAZAKI et al., 1991). Para evitar o excesso de EROs, o fluido folicular possui uma variedade de fatores antioxidantes, pois neste ambiente, o funcionamento e interação de células da granulosa, hormônios esteróides, fatores de crescimento, células de defesa e o próprio metabolismo do oócito são fontes produtoras de EROs (ATTARAN et al., 2000, DAS et al., 2006).

Em cultivo *in vitro*, as condições atmosféricas são caracterizadas por maiores concentrações de oxigênio em relação a ambientes *in vivo* e por isso resultam, inevitavelmente, em uma maior produção de EROs (BLONDIN et al., 1997).

Ramalho (2007) obteve efeitos benéficos com o uso da estimulação com laser de baixa potência em fibroblastos *in vitro*, quando cultivados sob altas

concentrações de glicose. Nas células não irradiadas foram observados um aumento na produção de EROs e, conseqüentemente, uma redução na proliferação e migração das células.

2.3.3 Apoptose

A apoptose, conhecida também como morte celular programada (MCP), é caracterizada pela autodigestão controlada de constituintes celulares, devido à ativação de proteases intracelulares (BETTS & KING, 2001), ativadas por genes e enzimas específicas. Morfologicamente, é um processo caracterizado por diminuição do volume celular, condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos, que impedem a liberação da matriz intracelular no meio extracelular (GABRIELLI et al., 2003; PLAETZER et al., 2005).

O aspecto bioquímico mais associado com a apoptose é a quebra do DNA nuclear, decorrente da ativação de enzimas proteolíticas, que ativam as DNases mediadoras da fragmentação do DNA cromossômico, bem como a lise de substratos específicos de proteínas, os quais determinam a integridade e a forma do citoplasma (SARASTE & PULKKI, 2000).

Os mecanismos de MCP podem ser ativados por estímulos externos, mediante ligação com receptores específicos da superfície celular ou por estímulos internos de estresse intracelular, que resultam em disfunção mitocondrial tais como: lesões do DNA, alterações nas vias metabólicas (aumento do cálcio intracelular, redução do pH, estresse oxidativo), presença de drogas e toxinas ou privação de fatores do crescimento. A presença desses sinais altera o padrão de proteínas mitocondriais pró-apoptóticas, as quais migram do citosol para a mitocôndria e iniciam a apoptose (GROSS et al., 1999; HENGARTNER, 2000; SMAILL et al., 2003).

Portanto, uma captação excessiva de cálcio pela mitocôndria, um aumento da exposição às EROS, ou um declínio da capacidade de produção de energia, por exemplo, podem induzir à abertura de canais não específicos da membrana interna, dando início a um colapso no potencial de membrana mitocondrial e

inchaço da membrana interna. Com isso, fatores pró-apoptóticos presentes na MMI, como o citocromo-c, o fator indutor de apoptose (AIF-flavoproteína) e as caspases (formas latentes de proteases) são liberados para o citosol. A citocromo-c ativa a via citosólica das caspases, provocando a destruição do citoplasma (CRYNS & YUAN, 1998) e o AIF se transloca para o núcleo, induzindo a destruição da cromatina nuclear.

A apoptose possui um papel fundamental durante o desenvolvimento ovariano e oogênese fetal, e, posteriormente também na vida adulta, nos processos de desenvolvimento folicular e luteólise (TILLY, 1996). Durante a vida reprodutiva da fêmea, a maioria dos folículos ovarianos sofre atresia e seus oócitos degeneram. Os folículos que não se submetem ao processo de atresia continuam a crescer até a ovulação. Após a ovulação, se a fertilização não ocorrer, o oócito perde a sua capacidade fertilizante e começa a se degenerar (TAKASE et al., 1995; YANG & RAJAMAHENDRAN, 2002; HAFEZ, B. & HAFEZ, E., 2000), provavelmente por apoptose (YANG & RAJAHAMENDRAN, 2002). Estudos têm elucidado, por exemplo, que oócitos com *cumulus* compacto são, via de regra, originados de folículos “saudáveis” ou daqueles apenas com sinais iniciais de atresia, visto que oócitos com *cumulus* incompleto e/ou expandido originam-se de folículos com sinais mais avançados de atresia. Yang e Rajamahendran (2002) constataram que COCs com qualidades morfológicas inferiores têm a maioria de seus oócitos com anomalias morfológicas incluindo retração e fragmentação do ooplasma e das COCs, características estas típicas de células submetidas ao processo de morte celular por apoptose (TILLY, 1996). Do mesmo modo, Takase et al. (1995) e Matwee et al. (1999) propuseram que a apoptose está relacionada ao processo de degeneração em oócitos imaturos de camundongos e bovinos. Fujino et al. (1996) propuseram que a fragmentação do DNA dos oócitos associada a apoptose pode ser uma das razões para a qualidade pobre dos oócitos e a baixa fertilidade de ratos envelhecidos.

Em células miogênicas cultivadas *in vitro*, a irradiação com laser de baixa potência induziu a um aumento na expressão de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2

(B cell leukemia/lymphoma 2) e a uma redução de expressão nas proteínas pró-apoptóticas Bax (SHEFER et al., 2002).

2.3.4 Cálcio

Em diferentes tipos celulares, o cálcio (Ca^{2+}) tem-se mostrado fundamental para a finalização de processos mitóticos e meióticos (WHITAKER & PATEL, 1990). Em oócitos mamíferos, estudos têm confirmado sua importância na maturação nuclear, evidenciando a necessidade de sua liberação para múltiplos eventos celulares. Dentre eles estão a ativação da histona H1, considerada desencadeadora universal da meiose em oócitos mamíferos (NURSE, 1990), e de MAPquinasas, que junto com uma cascata de outras quinases (SEGER & KREBS, 1995), participam da organização do eixo meiótico, extrusão do primeiro corpúsculo polar e interrupção do oócito em metáfase II (CHOI et al. 1996ab). Em oócitos bovinos e suínos, o uso de agentes quelantes de Ca^{2+} comprovou sua importância na quebra da VG e na progressão da meiose (HOMA, 1991; KAUFMAN & HOMA, 1993), bem como a sua necessidade para a reunião do citoesqueleto numa maturação citoplasmática normal (SANTELLA, 1999). O Ca^{2+} se faz necessário em cultivo de oócitos *in vivo* ou *in vitro*, onde grandes estoques do íon, bem como suas correntes através da membrana plasmática, refletem em melhor qualidade do gameta e maior competência no desenvolvimento (BONI, et al., 2002).

Um dos mecanismos primários de ação do laser é a aceleração na transferência de elétrons durante a OXPHOS (BOSSINI, 2007), o que gera uma maior movimentação de prótons através da membrana mitocondrial, com conseqüente aumento no potencial de sua membrana. Células excitáveis contêm canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes que as permitem aumentar os níveis de Ca^{2+} no citosol drasticamente. Quando ocorre a despolarização do potencial de sua membrana plasmática, os canais de cálcio voltagem-dependentes têm sua conformação alterada, permitindo um fluxo maior de Ca^{2+} através da membrana, que indiretamente estimula os receptores InsP_3 a liberar Ca^{2+} dos estoques

intracelulares (CLAPHAM, 1995). Em oócitos mamíferos, sabe-se que os receptores InsP_3 estão localizados em grande abundância e são mediadores nas oscilações de Ca^{2+} durante a maturação (CARROLL & SWANN, 1992) e fertilização (MIYASAKI et al., 1992).

Por outro lado, o aumento exagerado na matriz mitocondrial pode levar a uma maior produção nas EROs, estimulando a formação do poro de transição mitocondrial, a liberação do citocromo c e finalmente a apoptose (BROOKES et al., 2004).

Estudos utilizando a bioestimulação com laser de baixa potência em células osteoblásticas revelou uma tendência de mudança transitória positiva na concentração de Ca^{2+} após a irradiação (COOMBE, 2001) e uma alteração na atividade das ATPases de bombas iônicas presentes nas membranas (KUJAWA et al., 2004).

SILVA et al. (1993) evidenciaram a ativação de canais de Ca^{2+} específicos presentes na membrana plasmática de células ósseas quando submetidas a campos elétricos variáveis, resultando em um aumento na incorporação de cálcio iônico intracelular.

3. Material e métodos

3.1 Obtenção e maturação *in vitro* de oócitos bovinos

Os oócitos foram obtidos por aspiração folicular de ovários bovinos coletados em matadouro e, em seguida, foram selecionados e maturados *in vitro* em meios apropriados durante 24 horas em estufa com atmosfera úmida a 38,5°C e 5% de CO_2 , de acordo com metodologia descrita no apêndice A.

3.2 Equipamento de laser

Antes de se iniciar a maturação *in vitro*, os oócitos foram submetidos à irradiação com laser. A descrição do equipamento de laser bem como dos padrões

de irradiação utilizados neste e nos demais capítulos encontram-se detalhados no apêndice B.

3.3 Experimento I – Efeitos da irradiação de oócitos com laser infravermelho (780 nm) e visível (660 nm) na maturação nuclear e citoplasmática

Coloração de cromatina

O experimento avaliou os efeitos do laser infravermelho (780 nm) e do laser visível (660 nm) com diferentes tempos de irradiação na maturação nuclear dos oócitos. Foram utilizados 837 oócitos, sendo 356 destinados ao tratamento com laser infravermelho e 481 ao laser visível. Conjuntos de 20 a 25 oócitos foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos de tratamento: 30 segundos (**L30**), 60 segundos (**L60**), 120 segundos (**L120**) e 180 segundos (**L180**) de irradiação, dispostos sobre platina aquecedora, tendo a irradiação realizada individualmente para cada grupo. Grupos controle, respectivos aos tratados (**C30**, **C60**, **C120**, **C180**), foram submetidos à mesma manipulação, exceto pela irradiação e, em seguida, todas as placas contendo os oócitos foram acondicionadas em incubadora durante 24 horas.

Após 24 horas de maturação *in vitro*, iniciou-se o processo para coloração nuclear. Os oócitos foram retirados de suas gotas MIV e lavados em solução de hialuronidase a 0,2% [Hyalozima® (Aspen) em PBS livre de Ca^{2+} , com 0,1% de álcool polivinílico (PVA; Sigma P-8136)], sendo pipetados sucessivamente, para remoção de suas células do *cumulus*. Depois de desnudos, foram fixados em solução de paraformaldeído (Mallinckrodt 5016) a 3% (v/v) em PBS durante 1 hora e transferidos para solução de PBS com 0,1% de PVP, onde ficaram incubados a 4°C durante a noite. Em seguida foram corados com solução de Hoechst 33342 (10 µg/mL de SB) e visualizados em microscópio óptico de epifluorescência. A presença do primeiro corpúsculo polar (1ºCP) no espaço perivitelínico

acompanhado da metáfase II (MII) foi considerado como indicativo de sua maturação nuclear, enquanto a ausência do 1ºCP como imaturidade (Figura 5).



Figura 5. Oócito bovino evidenciando maturação nuclear após 24 horas de incubação *in vitro*, corado com 10g/mL de Hoechst 33342 durante 10 minutos e observado sob microscopia óptica epifluorescente. (MII) Metáfase II e (CP) corpúsculo polar presente no espaço perivitelínico (núcleo maturo).

Coloração de grânulos corticais

Com o objetivo de se avaliar a maturação citoplasmática oocitária em diferentes tempos de irradiação com o laser infravermelho e com o laser visível, foi feita a coloração de grânulos corticais (GC). Foram utilizados 845 oócitos, sendo 421 destinados ao tratamento com laser infravermelho e 424 ao laser visível. O delineamento experimental aqui utilizado foi idêntico ao do experimento I (acima descrito), até o momento da remoção das células do *cumulus*. Depois de desnudos, os oócitos foram transferidos para solução de pronase 5% (m/v) em meio TCM-HEPES, permanecendo nela durante 5 minutos para a dissolução de sua zona pelúcida. Em seguida, foram fixados em solução de formaldeído a 3% (v/v) em PBS durante 30 minutos e finalmente transferidos para solução de bloqueio SB - [PBS (solução salina tamponada com fosfato) com 1mg/mL de albumina sérica bovina (BSA; Sigma A-6003), 100mM de glicina (Plusone 17-1323-01) e 0,2% de azida de sódio (Sigma S-2002)], sendo incubados a 4°C durante uma noite. Para a permeabilização da membrana, os oócitos foram

expostos à SB acrescida de 0,1% de Triton X-100 (USB 22686) e mantidos assim por 5 minutos a 38°C. Para a coloração, foram mantidos em 10µg/mL conjugado de isotiocianato de fluoresceína *Lens culinaris* (FITC-LCA) em SB por 15 min e lavados em SB (5 min cada lavagem) e então colocados sob lâmina e lamínula e visualizados sob microscópio óptico de epifluorescência ($\lambda = 460$ a 490 nm). A distribuição dos GC foi utilizada como indicativo de maturação citoplasmática. Oócitos foram classificados como maduros quando apresentaram GC concentrados em sua periferia e imaturos quando os GC encontravam-se em “clusters” ou em processo de transição na maturação (quando estiveram espalhados por todo o citoplasma) (Figura 6).

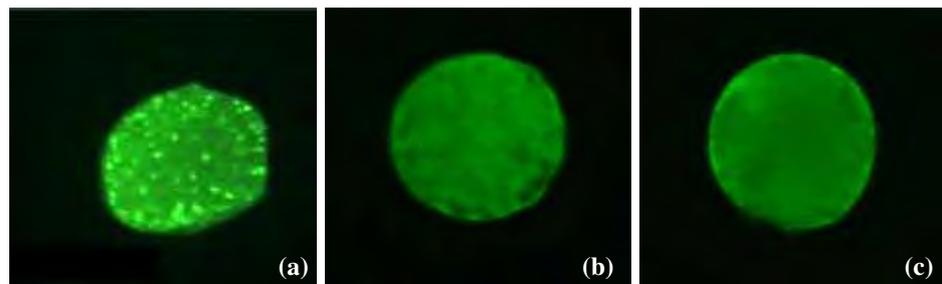


Figura 6. Distribuição dos grânulos corticais (GC) em oócitos bovinos maturados *in vitro* por 24 horas e observados sob microscópio óptico epifluorescente. (a) GC concentrados em “clusters” (citoplasma imaturo); (b) GC em transição do centro para a periferia (citoplasma imaturo); (c) GC localizados na periferia do ooplasma (citoplasma maturo). Coloração com 10 g/mL de *Lens culinaris* (específica à α -D-manose) conjugada a FITC por 15 minutos.

3.4 Experimento II – Efeitos da irradiação de oócitos com laser infravermelho (780 nm) e visível (660 nm) na produção de blastocistos

Neste experimento foi realizada a maturação oocitária e a irradiação do laser como descritas nos experimentos anteriores. Foram utilizados 1822 oócitos, sendo 810 destinados ao tratamento com laser infravermelho e 1012 ao laser visível. Após 24 horas de maturação, foi realizada a fertilização, de acordo com protocolo detalhado em apêndice C e seguiu-se com a co-incubação de oócitos e espermatozóides em estufa. Após 22 a 24 horas de cultivo, os supostos zigotos

tiveram suas células do *cumulus* removidas por sucessivas pipetagens e foram transferidos para gotas contendo meio de cultivo *in vitro* (CIV), sendo devolvidos para a incubadora, onde se desenvolveu o cultivo (apêndice D) até D7, quando foi quantificado o número de embriões produzidos em cada grupo em relação ao total de estruturas presentes nele.

3.5 Análise Estatística

Os dados foram avaliados utilizando metodologia de quadrados mínimos, por meio do procedimento PROC GLM com o programa *Statistical Analysis System*, versão 9.1.3 (SAS, 1995). As variáveis foram transformadas de acordo a função raiz arco-seno das percentagens de oócitos com maturação nuclear, migração de GC e embriões produzidos em relação ao total de oócitos destinados à maturação, conforme as recomendações de BANZATTO e KRONCA (2006). Posteriormente, as variáveis transformadas foram submetidas às análises de variância (ANOVA) e havendo significância nos resultados ($p < 0,05$), os dados foram analisados com procedimento de comparações múltiplas, o Teste *t* de Student, sendo, posteriormente, as médias retornadas à escala original para apresentação dos resultados.

4. Resultados

4.1 Experimento I - Efeitos da irradiação de oócitos com laser infravermelho (780 nm) e visível (660 nm) na maturação nuclear e citoplasmática

Coloração de cromatina

Os resultados obtidos após a coloração de cromatina dos oócitos dos grupos controle (C30, C60, C120, C180) e tratados (L30, L60, L120, L180) com os lasers infravermelho e visível foram descritos na Tabela 1 e Figura 7.

Tabela 1. Porcentagem de oócitos bovinos com maturação nuclear após 24 horas de cultivo *in vitro*.

Tempos de Irradiação	Oócitos com Maturação Nuclear (%* \pm Erro Padrão)			
	Laser Infravermelho		Laser Visível	
	C	L	C	L
30 seg.	81,84 \pm 6,69 ^a	88,92 \pm 7,73 ^a	71,59 \pm 5,99 ^a	65,81 \pm 5,47 ^a
60 seg.	87,40 \pm 6,69 ^a	83,56 \pm 7,73 ^{a,b}	69,62 \pm 5,47 ^b	62,75 \pm 5,99 ^b
120 seg.	85,30 \pm 6,69 ^a	76,06 \pm 7,73 ^a	64,04 \pm 5,47 ^a	70,38 \pm 5,99 ^a
180 seg.	80,16 \pm 6,69 ^a	77,42 \pm 7,73 ^a	67,41 \pm 5,47 ^a	56,72 \pm 5,99 ^a

*Valor calculado em função do número total de oócitos maturados *in vitro*.

^{a,b}Letras iguais entre colunas na mesma linha não diferem entre si.

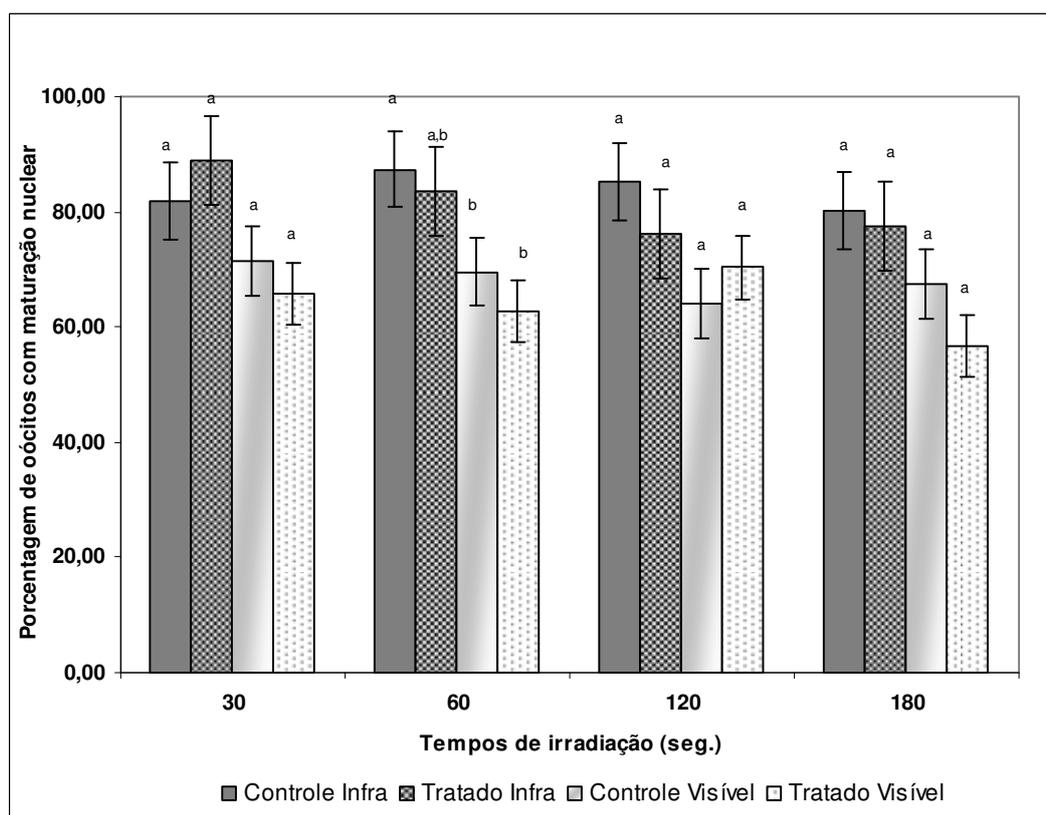


Figura 7. Porcentagem de oócitos bovinos com maturação nuclear após 24 horas de cultivo *in vitro*.

Os grupos tratados com laser infravermelho apresentaram médias de oócitos com maturação nuclear semelhante ($p>0,05$) aos seus respectivos grupos controle. No entanto, o grupo de tratamento com menor tempo de irradiação apresentou taxa de maturação nuclear numericamente maior (L30 - 88,92%) em relação ao seu grupo controle (C30 - 81,84%). Os grupos tratados com maiores tempos de irradiação, ao contrário, mostraram taxas de maturação nuclear numericamente menores (L60 - 83,56%; L120 - 76,06%; L180 - 77,42%) em relação a seus respectivos grupos não tratados (C60 - 87,40%; C120 - 85,30%; C180 - 80,16%). Os oócitos irradiados com laser visível não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p>0,05$) na maturação nuclear em relação aos oócitos dos grupos controle. Todos os grupos tratados mostraram taxas de maturação nuclear numericamente menores (L30 - 65,81%; L60 - 62,75%; L120 - 70,38%; L180 - 56,72%) em relação aos grupos controle (C30 - 71,59%; C60 - 69,62%; C120 - 64,04%; C180 - 67,41%).

Coloração de grânulos corticais

Os resultados obtidos após a coloração de grânulos corticais dos oócitos dos grupos controle (C30, C60, C120, C180) e tratados (L30, L60, L120, L180) com os lasers infravermelho e visível foram descritos na Tabela 2 e Figura 8.

Tabela 2. Porcentagem de oócitos bovinos com grânulos corticais localizados à periferia após 24 horas de maturação *in vitro*.

Tempos de Irradiação	Oócitos com GC ¹ Periféricos (%* \pm Erro Padrão)			
	Laser Infravermelho		Laser Visível	
	C	L	C	L
30 seg.	61,04 \pm 9,75 ^a	86,18 \pm 9,02 ^a	74,42 \pm 11,94 ^a	81,08 \pm 10,68 ^a
60 seg.	56,16 \pm 9,75 ^a	66,03 \pm 7,96 ^a	61,63 \pm 11,94 ^a	68,11 \pm 9,02 ^a
120 seg.	79,81 \pm 8,44 ^a	53,75 \pm 9,02 ^a	48,33 \pm 11,94 ^a	75,95 \pm 9,02 ^a
180 seg.	82,05 \pm 9,02 ^a	57,70 \pm 7,96 ^a	59,52 \pm 11,94 ^a	77,77 \pm 9,75 ^a

¹GC = Grânulos Corticais

*Valor calculado em função do número total de oócitos maturados *in vitro*.

^{a,b}Letras iguais entre colunas na mesma linha não diferem entre si.

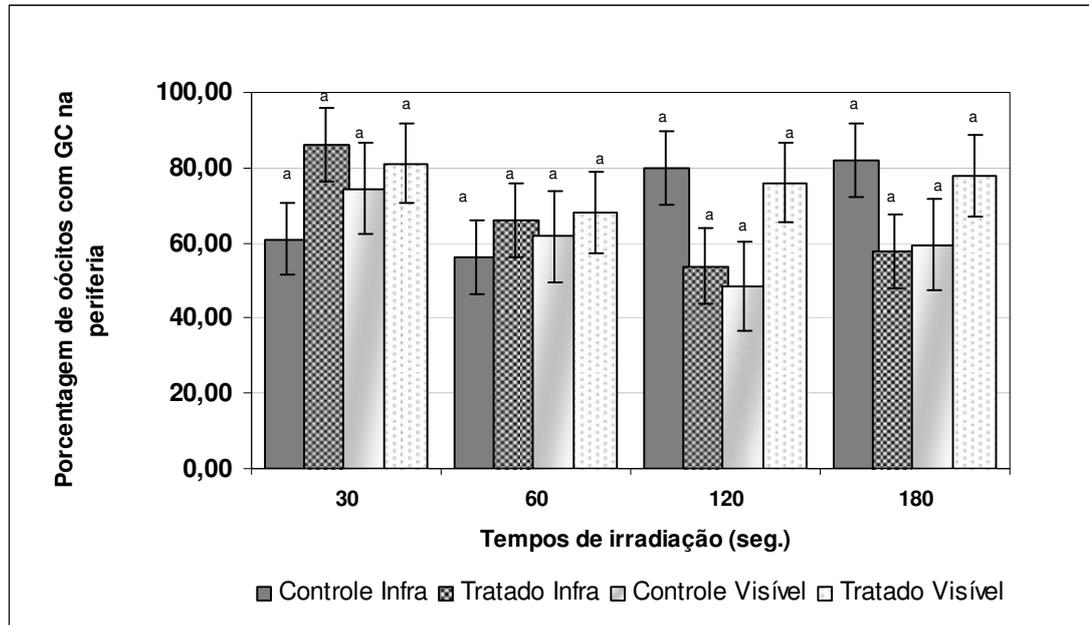


Figura 8. Porcentagem de óócitos bovinos com Grânulos Corticais (GC) localizados à periferia após 24 horas de maturação *in vitro*.

Os grupos tratados com laser infravermelho apresentaram médias de óócitos com GC periféricos semelhantes ($p > 0,05$) aos seus respectivos grupos controle. No entanto, os grupos de tratamento com menores tempos de irradiação mostraram taxas de migração dos GC numericamente maiores (L30 – 86,18%; L60 – 66,03%) em relação aos respectivos grupos controle (C30 – 61,04%; C60 – 56,16%). Os óócitos irradiados com laser visível não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) na migração de GC para a periferia em relação aos óócitos dos grupos controle. No entanto, houve, numericamente, maiores taxas ($p > 0,05$) de GC periféricos em todos os grupos tratados (L30 – 81,08%; L60 – 68,11%; L120 – 77,95%; L180 – 77,77%) em relação aos seus controles (C30 – 74,42%; C60 – 61,63%; C120 – 48,33%; C180 – 59,52%), sendo estas mais evidentes nos grupos com maiores tempos de irradiação (L120 e L180).

4.2 Experimento II - Efeitos da irradiação de oócitos com laser infravermelho (780 nm) e visível (660 nm) na produção de blastocistos

Os resultados obtidos à produção de embriões nos grupos controle (C30, C60, C120, C180) e tratados (L30, L60, L120, L180) com os lasers infravermelho e visível foram descritos na Tabela 3 e Figura 9.

Tabela 3. Porcentagem de produção de embriões ao sétimo dia de cultivo, em relação ao total de oócitos destinados à maturação *in vitro*.

Tempos de Irradiação	Produção de embriões ao D7 ¹ (%* ± Erro Padrão)			
	Laser Infravermelho		Laser Visível	
	C	L	C	L
30 seg.	42,60 ± 5,75 ^a	29,20 ± 5,75 ^a	43,36 ± 4,86 ^a	42,20 ± 4,54 ^a
60 seg.	31,00 ± 5,75 ^a	32,00 ± 5,75 ^a	38,00 ± 5,75 ^a	40,13 ± 4,54 ^a
120 seg.	35,00 ± 5,75 ^a	38,00 ± 5,75 ^a	47,14 ± 4,86 ^a	39,54 ± 4,54 ^a
180 seg.	32,00 ± 5,75 ^b	37,00 ± 5,75 ^b	56,67 ± 5,25 ^a	36,42 ± 4,54 ^b

¹D7 = sétimo dia de cultivo *in vitro*.

*Valor calculado em função do número total de oócitos maturados *in vitro*.

^{a,b}Letras iguais entre colunas na mesma linha não diferem entre si.

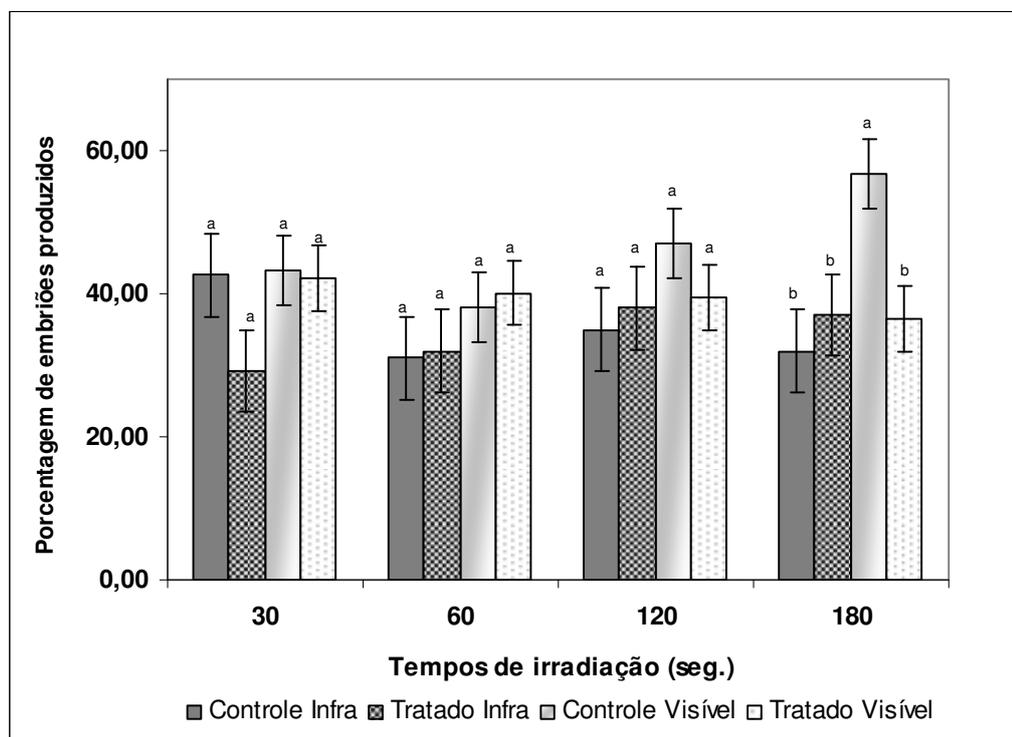


Figura 9. Porcentagem de produção de embriões no D7, em relação ao total de oócitos destinados à maturação *in vitro*.

Os grupos tratados com laser infravermelho apresentaram médias de produções de blastocistos semelhantes ($p>0,05$) às médias de seus respectivos grupos controle. No entanto, se observaram nos grupos tratados com maiores tempos de irradiação, taxas de produção de embriões (L120 - 38,0% e L180 - 37,0%) numericamente maiores em relação aos seus respectivos grupos não irradiados (C120 - 35,0% e C180 - 32,0%). Com relação ao tratamento com laser visível, o grupo tratado com maior tempo de irradiação apresentou menor taxa de produção de embriões (L180 - 36,0%) em relação ao grupo controle respectivo C180 - 56,0%). Os grupos tratados com menores tempos de irradiação não mostraram diferenças estatísticas significativas na produção embrionária ($p>0,05$), apesar de ter havido uma taxa de produção numericamente menor no grupo L120 (39,0%) em relação ao grupo controle respectivo (C120 - 47,0%).

5. Discussão

5.1 Experimento I - Efeitos da irradiação de oócitos com laser infravermelho (780 nm) e visível (660 nm) na maturação nuclear e citoplasmática

Dentre os resultados obtidos, observou-se que as irradiações com os lasers infravermelho e visível não alteraram as taxas de maturação nuclear oocitária, independentemente do tempo de tratamento adotado. Com relação ao laser infravermelho, nota-se que os oócitos irradiados durante 30 seg. mostraram taxas de maturação nuclear numericamente maiores em relação aos oócitos não irradiados, ao passo que os grupos tratados com 60, 120 e 180 seg. apresentaram taxas numericamente menores em relação aos respectivos grupos controle. Tem sido relatado que gametas femininos sejam possivelmente mais sensíveis à irradiação com laser em relação às células somáticas, sugerindo que células não diferenciadas sejam mais foto-sensíveis do que células diferenciadas. Uma das hipóteses explicativas para tais sugestões seria a suposta ação destruidora do

laser na ligação entre microtúbulos e cinetocoros do oócito, durante a passagem do estágio de anáfase para telófase, inibindo a separação do 1º CP e mantendo o gameta em diploidia (BERNS et al., 1991). Essa teoria poderia ser uma das explicativas para as taxas de maturação numericamente prejudicadas após os maiores períodos de irradiação com o laser infravermelho. A partir desses dados, pode-se sugerir que tempos curtos de irradiação com laser infravermelho tenderiam à bioestimulação do processo de maturação nuclear, enquanto que tempos maiores poderiam prejudicá-lo.

Com relação aos grupos tratados com o laser visível, nossos resultados mostraram índices numéricos de maturação nuclear menores do que os respectivos grupos controle, quando utilizados tempos de irradiação de 30, 60 e 180 seg. As diferenças numéricas entre grupos tratados e controle foram semelhantes quando utilizados tempos de irradiação de 30 e 60 seg., mas aumentaram quando utilizados o maior tempo, de 180 seg. Já os oócitos tratados com 120 seg. de irradiação apresentaram taxas de maturação nuclear numericamente maiores em relação ao seu grupo controle. Conforme se elevou a duração da irradiação, aumentou-se consequentemente a energia total e a fluência utilizadas, dessa maneira, o maior tempo de irradiação utilizado acarretou uma maior energia total e fluência aplicadas em relação aos tratamentos com o laser visível. Em conjunto, tais padrões de irradiação tenderam a prejudicar a maturação nuclear neste grupo em relação ao controle mais do que nos outros tempos utilizados. Isso está de acordo com um estudo desenvolvido por Ocaña-Quero et al. (1998), no qual o número de oócitos com núcleo maturo foi menor quando se utilizou um laser de HeNe (632.8 nm; 10 mW; 0,05W/cm²) durante 1 a 5 seg., sendo que a exposição dos oócitos à maior fluência (0,25 J/cm²), levou a menores taxas de meiose completa quando comparados àqueles expostos à menor fluência (0,05 J/cm²). Ainda neste estudo, as porcentagens de degeneração oocitária nos grupos irradiados com ambas as fluências foram significativamente maiores do que os grupos controle, sendo que no tratamento com fluência de 0,25 J/cm² as taxas foram superiores às dos grupos tratados com 0,05 J/cm² e dos

grupos controle. Efeitos prejudiciais da luz visível também foram relatados por Hirao e Yanagimachi (1978), quando oócitos de hamster não fertilizados tiveram sua maturação nuclear comprometida após exposição prolongada a radiações operando entre 470 e 480 nm.

A maturação citoplasmática dos oócitos foi avaliada por meio da distribuição de GC após 24 horas de incubação *in vitro*. Verificamos que as irradiações com os lasers infravermelho e visível em oócitos, durante os diversos tempos de tratamento propostos, não elevaram estatisticamente as taxas de GC presentes na periferia. Porém, nota-se que todos os grupos tratados com laser visível e os grupos tratados com laser infravermelho durante 30 e 60 seg., apresentaram taxas de migração de GC numericamente maiores em relação aos seus grupos controle. O processo de maturação citoplasmática envolve, dentre diversos mecanismos, o aumento intracelular de íons Ca^{2+} , induzidos pela ativação de receptores InsP3, o que acarreta em alterações nos filamentos de actina do oócito, os quais orientam o movimento dos GC em direção à periferia citoplasmática (SANTELLA et al., 1999). Baseados em nossos resultados e nos relatos que afirmam uma ação estimulatória do laser na liberação de cálcio (COOMBE, 2001; KUJAWA et al., 2004), pode-se sugerir, mesmo sem diferenças estatísticas, um efeito benéfico do laser sobre a migração de GC. Uma das possíveis razões para a ausência de diferenças estatísticas entre grupos tratados e controle seria o momento da irradiação, já que há suposições de que o máximo da migração de GC aconteça durante os estágios finais da maturação oocitária (CONNORS et al., 1998). Segundo Karu et al. (1996), os efeitos secundários provocados pela bioestimulação com laser, os quais envolvem a transmissão do foto-sinal e uma cascata de diversas reações bioquímicas, não acontecem no momento da irradiação, mas num período posterior a ela, que pode se estender de minutos a horas. Em nosso trabalho, as irradiações foram realizadas imediatamente antes do início da incubação dos oócitos *in vitro*, podendo não ter exercido efetivamente seu suposto efeito estimulatório no momento de maior migração dos GC. Em estudo desenvolvido por Ocaña-Quero et al. (1998),

irradiações sobre oócitos bovinos com laser visível (He-Ne operando com 632,8 nm; 10 mW; 0,05 W/cm²), imediatamente anterior à incubação *in vitro*, exerceram um efeito prejudicial sobre o citoplasma, verificado pela intensa vacuolização nos grupos tratados durante 1 a 5 seg., em relação aos não irradiados, os quais apresentaram citoplasma homogêneo.

Ao analisarmos os dados referentes aos oócitos irradiados com laser infravermelho, nota-se que nos grupos tratados com 30 e 60 seg. as taxas de migração de GC foram numericamente maiores em relação aos seus grupos controle, sendo esta diferença mais acentuada no grupo tratado durante 30 seg. e menos evidente no tratado com 60 seg., enquanto que nos grupos irradiados com 120 e 180 seg., as taxas foram numericamente menores em relação aos grupos controle. Esses dados sugerem que a irradiação com laser infravermelho tende a apresentar melhores resultados na migração de grânulos corticais de oócitos quando aplicada durante períodos menores de tempo.

Já em relação à irradiação com laser visível, todos os grupos tratados apresentaram taxas de migração de GC numericamente maiores em relação aos grupos não irradiados, sendo esta diferença mais marcante nos grupos tratados com 120 e 180 seg. Ao contrário do laser infravermelho, esses índices sugerem que a irradiação com laser visível tende a melhorar a migração de GC com períodos de irradiação mais longos. Resultados publicados por Ocaña-Quero et al. (1998) evidenciaram que os oócitos expostos à fluência de 0,25 J/cm², apresentaram maior número de vacúolos citoplasmáticos comparados aos oócitos irradiados com 0,05 J/cm², o que está de acordo com nossos dados, já que as maiores fluências (120 e 180 J/cm²) referentes aos tempos de 120 e 180 seg. de irradiação, apresentaram melhores taxas numéricas de migração de GC, o que poderia influenciar positivamente a maturação citoplasmática.

5.2 Experimento II - Efeitos da irradiação de oócitos com laser infravermelho (780 nm) e visível (660 nm) na produção de blastocistos

Apesar da ausência de diferenças estatísticas na produção embrionária entre grupos tratados com laser infravermelho e grupos controle, nota-se que, ao irradiarmos os oócitos durante 30 seg., numericamente a taxa de produção de embriões foi acentuadamente menor em relação aos oócitos não irradiados. No entanto, as irradiações com tempos de 60, 120 e 180 seg. fizeram com que as taxas de produção embrionária fossem numericamente maiores em relação às taxas dos grupos não irradiados, de forma que ao se elevar o tempo, e, portanto, a fluência do tratamento, elevou-se também as diferenças nos índices entre os grupos tratados e grupos controle. Os resultados obtidos no experimento anterior demonstraram que o uso de irradiações com maiores fluências beneficiou numericamente as taxas de migração de GC, e este efeito benéfico progressivo também poderia estar sendo obtido com relação à produção embrionária. Dessa forma, pode-se sugerir a adoção de tempos de tratamento mais longos do que os utilizados no experimento, poderia gerar efeitos benéficos no desenvolvimento embrionário, elevando seus índices.

Com relação à irradiação com laser visível, nossos dados revelaram que sua aplicação sobre oócitos durante 180 seg. reduziu acentuadamente as taxas de produção de embriões. Apesar dos outros tempos de tratamento não terem alterado estatisticamente tais índices, o grupo tratado durante 120 seg. apresentou taxa numérica de produção embrionária menor em relação ao seu grupo controle. Somente no grupo tratado durante 60 seg. houve uma produção de embriões numericamente maior em relação ao grupo controle, no entanto, essa diferença foi discreta. Tais dados sugerem que irradiações de oócitos com tempos acima de 180 segundos prejudicam a produção embrionária, devendo, portanto, serem utilizados menores tempos de irradiações, preferencialmente abaixo de 120 seg.

Ao confrontarmos os dados obtidos no experimento I com os dados obtidos no experimento II, nota-se que na maioria dos tratamentos, os efeitos numéricos

benéficos obtidos na maturação nuclear e/ou citoplasmática, não foram acompanhados numericamente de maiores taxas de produção de blastocistos, como, por exemplo, no grupo irradiado durante 30 seg. com o laser infravermelho, e no grupo tratado durante 120 seg. com o laser visível. Da mesma maneira, quando os efeitos das irradiações foram numericamente prejudiciais em alguns grupos de tratamento, como no grupo irradiado com o laser infravermelho durante 180 seg., não houve menor produção de embriões. A partir desses resultados, pode-se inferir que as irradiações com ambos os lasers possam ter estimulado ou inibido eventos metabólicos que influenciam a produção embrionária e que não dependem dos processos de maturação nuclear ou citoplasmática, como o conteúdo de ATP oocitário. Estudos desenvolvidos por Stojkovic et al. (2001) mostram que a habilidade em extrair o corpúsculo polar não afetou a capacidade em aumentar a quantidade de ATP em oócitos bovinos, sendo este fundamental para processos posteriores à maturação, como a ativação, a fertilização e o posterior desenvolvimento (VAN-BLERKOM & RUNNER, 1984; CALARCO, 1995; VAN-BLERKOM et al., 1995; DE LOOS et al., 1992; THOMPSON et al., 2000). O ATP parece ser gerado por meio de proteínas e transcritos mitocondriais durante a oogênese (CUMNINS, 2004) e, como já hipotetizado em diversos modelos celulares, acredita-se que o laser visível e infravermelho próximo ativem o transporte de elétrons da cadeia respiratória (BOSSINI, 2007), resultando em um aumento dos níveis de ATP mitocondrial. Dessa maneira, pode-se explicar os efeitos benéficos ou prejudiciais das irradiações com os lasers infravermelho e visível nos oócitos sobre as taxas numéricas de produção embrionária ao sétimo dia de cultivo *in vitro*.

6. Conclusões

Diante dos resultados obtidos nos experimentos, pode-se concluir que:

- As taxas de maturação nuclear e citoplasmática *in vitro*, avaliada por meio da migração de grânulos corticais não foram afetadas após a irradiação de oócitos bovinos com diodo laser infravermelho (semicondutor operando em 780 nm) e visível (semicondutor operando em 660 nm), aplicada durante 30, 60, 120 e 180 segundos, imediatamente antes da maturação *in vitro*.

- A irradiação com laser infravermelho (semicondutor operando em 780 nm) aplicada em oócitos bovinos durante 30, 60, 120 e 180 segundos, imediatamente antes da maturação *in vitro*, não alterou as taxas de produção embrionária ao sétimo dia de cultivo *in vitro*.

- A irradiação com laser visível (semicondutor operando em 660 nm) aplicada em oócitos bovinos durante 180 segundos, imediatamente antes da maturação *in vitro*, reduziu a taxa de produção embrionária ao sétimo dia de cultivo *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ATTARAN, M.; PASQUALOTTO, E.; FALCONE, T.; GOLDBERG, J.M.; MILLER K.F.; AGARWAL, A.; SHARMA, R.K. The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. **Internatinal Journals of Fertility Womens Medicine**, v.45, n.5, p.314-320, 2000.
- BAKEEVA, L.E.; MANTEĬFEL', V. M.; RODICHEV, E. B.; KARU, T.I. Formation of gigantic mitochondria in human blood lymphocytes under the effect of an He-Ne laser. **Molekuliarnaia Biologiia (Moskva)**, v.27, n.3, p.608-617, 1993.
- BANZATTO, D.A.; KRONCA, S.N. **Experimentação Agrícola**. Ed. Funep, Jaboticabal, FCAV-UNESP, 4ª ed. p.237, 2006.
- BERNS, H.W.; WRIGHT, W.H.; STENBING, R.W. Laser microbeam as a tool in cell biology. **International Review of Cytology**, v.129, p.1-43, 1991.
- BETTS, D.H.; KING, W.A. Genetic regulation of embryo death and senescence. **Theriogenology**. Los Altos, v.55, p.171-191, 2001.
- BLONDIN, P.; COENEN, K.; SIRARD, 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.
- BONI, R.; CUOMO, A.; TOSTI, E. Developmental Potential in Bovine Oocytes Is Related to Cumulus-Oocyte Complex Grade, Calcium Current Activity, and Calcium Stores. **Biology of Reproduction**, v.66, p.836-842, 2002.
- BOSSINI, P.S. **Laser de baixa intensidade (670 nm) na viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos**. 132f. Tese (Mestrado em Bioengenharia). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
- BRACKETT, B.G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M.L.; DONAWICK, W.J.; EVANS, J.F.; DRESSEL, M.A. Normal development following in vitro fertilization in cow. **Biology of Reproduction**, p. 147-158, 1982.
- BROOKES, P.S.; YON, Y.; ROBOTHAM, J.L.; AMDERS, M.W.; SHEU, S.S. Calcium, ATP and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. **American Journal of Physiology: Cell Physiology**, Bethesda, v.287, p.C837-33, 2004.
- CALARCO, P.G. Polarization of mitochondria in the unfertilized mouse oocyte. **Molecular Reproduction and Development**, v.16, p.36-43, 1995.

CARROLL, J.; SWANN, K. Spontaneous calcium oscillations driven by inositol trisphosphate occur during in vitro maturation of mouse oocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v.267:111, p.96-201, 1992.

CHOI, T.; FUKASAWA, K.; ZHOU, R.; TESSAROLLO, L.; BORROR, K.; RESAU, J.; VANDE WOUDE, G.E. The mos/MAPK pathway regulates the size and degradation of the first polar body in maturing mouse oocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (Washington, DC)**, v.93, p.7032-7035, 1996a.

CHOI, T.; RULONG, S.; RESAU, J.; FUKASAWA, K.; MATTEN, W.; KURIYAMA, R.; MANSOUR, S.; AHN, N.; VANDE WOUDE, G.E. Mos/MAPK can induce early phenotypes in the absence of MPF: a novel system for analyzing spindle formation during meiosis 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (Washington, DC)**, v.93, p.4730-4735, 1996b.

CLAPHAM, D.E. Calcium Signaling. **Cell**, v.80, p.259-268, 1995.

CONNORS, S.A.; KANATSU-SHINOHARA, M.; SCHULTZ, R.M.; KOPF, G.S. Involvement of the cytoskeleton in the movement of cortical granules during oocyte maturation, and cortical granule anchoring in mouse eggs. **Developmental Biology**, v.200, p.103–115, 1998.

COOMBE, A.R.; HO, C.T.; DARENDELILER, M.A.; HUNTER, N.; PHILIPS, J.R.; CHAPPLE, C.C.; YUM, L.W. The effects of low level laser irradiation on osteoblastic cells. **Clinical Orthopedics and Related Research**, v.4, p.3-14, 2001.

CRYNS, V.; YUAN, J. Proteases to die for. **Genes and Development**, v.12, n.11, p.1551-1570, 1998.

CUMMINS, J.M. The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. **European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology**, v.115, S23–S29, 2004.

DA SILVA, D.S. **Produção in vitro de embriões bovinos com cisteamina**. 43 f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

DAS, S.; CHATTOPADHYAY, R.; GHOSH, S.; GOSWAMI, S.K.; CHAKRAVARTY, B.N.; CHAUDHURY, K. Reactive oxygen species level in follicular fluid – embryo quality marker in IVF?. **Human Reproduction**, v.21, n.9, p.2403-2407, 2006.

DE LOOS, F.; VAN MAURIK, P.; VAN BENEDEN, T.; KRUIP, T.A.M. Structural aspects of bovine oocyte maturation *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v.31, p.208–214, 1992.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Nucleus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, v.43, p.503-512, 1996.

FUJINO, Y.; OZAKI, K.; YAMAMASU, S.; ITO, F.; MATSUOKA, I.; HAYASHI, E.; NAKAMURA, H.; OGITA, S.; SATO, E.; INOUE, M. DNA fragmentation of oocytes in aged mice. **Human Reproduction**, v.11, n.7, p.1480-1483, 1996.

GABRIELLI, D.S.; BELISLE, E.; DIVINOMAR, S.; KOWALTOWSKI, A.J.; BAPTISTA, M.R. Binding, aggregation, and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions. **Photochemistry and Photobiology**, v.77, p. 227-232, 2003.

GROSS, A.; MCDONNELL, J.M.; KORSMEYER, S.J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. **Genes and Development**, v.13, p.1899-1811, 1999.

GUÉRIN, P.; MOUATASSIM, S.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the preimplantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**, v.7, n.2, p.175-189, 2001.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reproduction in farm animals**. 7.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 2000, 509p.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v.407, p.770-776, 2000.

HERBERT, K.E.; BHUSATE, L.L.; SCOTT, D.L., DIAMANTOPOLOS, C. Effect of laser light at 820 nm on adenosine nucleotide levels in human lymphocytes. **Lasers in the Life Sciences**, v.3, p.37-46, 1989.

HIRAO, Y.; YANAGIMACHI, R. Detrimental effect of visible light on meiosis of mammalian eggs *in vitro*. **Journal of Experimental Zoology**, v.206, p.365-370, 1978.

HOMA, S.T. Neomycin, an inhibitor of phosphoinositide hydrolysis, inhibits the resumption of bovine oocyte spontaneous meiotic maturation. **Journal of Experimental Zoology**, v.258, p.95-103, 1991.

HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, T.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v.47, p.23-32, 1997.

JANSEN, R.P.S.; de BOER, K. The bottleneck: mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.145, n.1-2, p.81-88, 1998.

KARU, T.I.; PYATIBRAT, L.V.; KALENDO, G.S.; ESENALIEV, R.O. Effects of monochromatic low-Intensity light and laser irradiation on adhesion of HeLa cells *in vitro*. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.18, p.171-177, 1996.

KARU, T.I.; PYATIBRAT, L.V.; KALENDO, G.S. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated *in vitro*. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v.27, p.219-233, 1995.

KARU, T.I. **The science of low-power laser therapy**. Austrália: Gordon and Breach Science Publishers, 1998.

KAUFMAN, M.L.; HOMA, S.T. Defining role for calcium in the resumption of meiosis in the pig oocyte. **Journal of Experimental Zoology**, v.265, p.69-76, 1993.

KUJAWA, J.; ZAVODNIK, L.; ZAVODNIK, I.; BUKO, V.; LAPSHYNA, A.; BRYSEWSKA, M. Effect of low-intensity (3.75-25 J/cm²) near-infrared (810 nm) laser radiation on red blood cell ATPase activities and membrane structure. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v.22, n.2, p.111-117, 2004.

LEEuw, A.M. Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: A 2005 status. **Theriogenology**, v.65, p.914-925, 2006.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; CRITSER, E.S.; EYESTONE, W.H.; NORTHEY, D. L.; FIRST, N.L. Development potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. **Biology of Reproduction**, v.36, p.376-383, 1987.

MATWEE, C.; BETTS, D.H.; KING, W.A. Developmental regulation of apoptosis in the early bovine embryo. **Theriogenology**, v.51, p.185, 1999.

MÉO-NICIURA, S.C. 2005. **Interação núcleo-citoplasmática em embriões e expressão de genes "imprinted" em fetos bovinos produzidos in vivo, in vitro e partenogenéticos**. 115f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

MESQUITA, L.G. 2005. **Bloqueio da fosforilação oxidativa no cultivo de embriões bovinos**. 74f. Tese (Mestrado em Zootecnia). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

MIYAZAKI, S.; YUZAKI, M.; NAKADA, K.; SHIRAKAWA, H.; NAKANISHI, S.; NAKADE, S.; MIKISHIBA, K. Block of Ca^{2+} wave and Ca^{2+} oscillation by the antibody to the inositol 1,4,5,-trisphosphate receptor in fertilized hamster eggs. **Science**, v.257, p.251-255, 1992.

NEDELINA, O.S.; BRZHEVSKAIA, O.N.; KAIUSHIN, L.P. Redox regulation in ATP synthesis. **Biofizika**, v. 30, n. 1, p. 179-191, 1985.

NURSE P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. **Nature**, v.344, p.503-508, 1990.

OCAÑA-QUERO, J.M.; GOMEZ-VILLAMANDOS, M.; MORENO-MILLAN, M.; SANTISTEBAN-VALENZUELA, J.M. Helium-Neon (He-Ne) laser irradiation increases the incidence of unreduced bovine oocytes during the first meiotic division *in vitro*. **Lasers in Medical Science**, v.13, p. 260-264, 1998.

ORTIZ, M.C.S.; CARRINHO, P.M.; DOS SANTOS, A.A.S.; GONÇALVES, R.C.; PARIZOTTO, N. A. Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades – parte 1. **Fisioterapia Brasil**. v. 2, n. 4, p. 221-240, 2001.

PEREZ, G.I.; TRBOVICH, A.M.; GOSDEN, R.G.; TILLY, J.L. Mitochondria and the death of oocytes. **Nature**, v.403, n.6769, p.500-1, 2000.

PLAETZER, K.; KIESSLICH, T.; OBBERDANER, C.B.; KRAMMER, B. Apoptosis flowing photodynamic tumor therapy: induction, mechanisms and detection. **Current Pharmaceutical Design**, v.11, p.1151-1165, 2005.

PICTON, H., DAVID, B., ROGER G. The molecular basis of oocyte growth and development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.145, p.27-37, 1998.

RAMALHO, K. M. 2007. **Terapia com laser em baixa intensidade na prevenção dos efeitos causados pela baixa concentração de glicose na proliferação e migração de fibroblastos**. 36f. Tese (Mestrado em Ciências). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

REYNIER, P.; MAY-PANLOUP, P.; CHRÉTIEN, M.F.; MORGAN, C.J.; JEAN, M.; SAVAGNER, F.; BARRIÈRE, P.; MALTHIÈRY, Y. Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. **Molecular Human Reproduction**, v.7, n.5, p.425-429, 2001.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P.; LONERGAN P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, v.61, p.234-248, 2002.

SANTELLA, L.; DE RISO, L.; GRAGNANIELLO, G.; KYOZUKA, K. Cortical granule translocation during maturation of starfish oocytes requires cytoskeletal rearrangement triggered by InsP₃-Mediated Ca²⁺ release. **Experimental Cell Research**, v.248, n.2, p.567-574, 1999.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular Research**, v.45, n.3, p.528-537, 2000.

SAS. **USER'S GUIDE: basic and statistic**. Cary, NC: SAS, p.1.686, 1995.

SEGER, R.; KREBS, E.G. The MAPK signaling cascade. **FASEB J.**, v.9, p.726-735, 1995.

SHEFER, G.; PARTRIDGE, T.A.; HESLOP, L.; GROSS, J.G.; ORON, U.; HALEVY, O. Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells. **Journal of Cell Science**, v.115, p.7, 1460-169, 2002.

SILVA, O.L.; REINBOLD, K.A.; POLLACK, S.R. The effects of 1.5 MHz Electric Field Stimulation in Primary Bone Cells Cultures. In: **Electricity and Magnetism in Biology in Medicine**. San Francisco: Martin Blank, 1993, p.905-908.

SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v.65, p.126-36, 2006.

SMAILI, S.S.; HSU, Y-T.; CARVALHO, A.C.P.; ROSENSTOCK, T.R.; SHARPE, J.C.; YOULE, R.J. Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, p.183-190, 2003.

SMEITINK, J.A.; MASSIMO, Z.; TUMBULL, D.M.; JACOBS, H.T. Mitochondrial medicine: A metabolic perspective on the pathology of oxidative phosphorylation disorders. **Cell Metabolism**, v.3, p.9-13, 2006.

STOJKOVIC, M., MACHADO, S.A., STOJKOVIC, P., ZAKHARTCHENKO, V., HUTZLER, P., GONÇALVES, P.B., WOLF, ECKHARD. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. **Biology of Reproduction**, v.64, p.904-909, 2001.

TAKASE, K.; ISHIKAWA, M.; HOSHIAI, H. Apoptosis in the degeneration apoptosis of unfertilized mouse ova. **Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v.175, p.69-76, 1995.

THOMPSON, J.G.; MCNAUGHTON, C.; GASPARRINI, B.; MCGOWAN, L.T.; TERVIT, H.R. Effect of inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation during compaction and blastulation of bovine embryos cultured *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.118, p.47–55, 2000.

TILLY, J.L. Apoptosis and ovarian function. **Reviews of Reproduction**, v.1, p. 162-172, 1996.

VAN BLERKOM, J.; DAVIS, P.; LEE, J. ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after *in vitro* fertilization and embryo transfer. **Human Reproduction**, v.10, p.415–424, 1995.

VAN BLERKOM, J.; RUNNER, M.N. Mitochondrial reorganization during resumption of arrested meiosis in the mouse oocyte. **The American Journal of Anatomy**, v.171, p.335-355, 1984.

VAN BLERKOM, J.; SINCLAIR, J.; DAVIS, PATRICK. Mitochondrial transfer between oocytes: potential applications of mitochondrial donation and the tissue of heteroplasmy. **Human Reproduction**, v. 13, n. 10, p. 2857-2868, 1998.

VAN DEL HEUVEL, L.; SMEITINK, J. The oxidative phosphorylation (OXPHOS) system: nuclear genes and human genetic diseases. **Bio Essays**, v.23, n.6, p.518-525, 2001.

VAN WEZEL, I.; RODGERS, R.J. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment *in vivo*. **Biology of Reproduction**, v. 55, p.1003-11, 1996.

WHITAKER, M.J.; PATEL, R. Calcium and cell cycle control. **Development**, v.108, p.525-542, 1990.

YANG, M.Y.; RAJAMAHENDRAN, R. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v.70, n.3-4, p. 159-169, 2002.

CAPÍTULO 3 – EFEITOS DA IRRADIAÇÃO COM LASERS DE BAIXA POTÊNCIA NA FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS

Título

Efeitos da Irradiação com Lasers de Baixa Potência na Fertilização *In Vitro* de Oócitos Bovinos

Resumo

RESUMO – Os processos de capacitação espermática e reação acrossomal que ocorrem no espermatozóide são fundamentais para a fertilização do oócito. Para isso devem ocorrer modificações no cálcio intracelular e na fosforilação protéica. A irradiação celular com laser de baixa potência pode estimular o potencial de membrana mitocondrial interna, aumentando o influxo de cálcio, a fosforilação oxidativa e a produção de espécies reativas do oxigênio. O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos da irradiação com lasers infravermelho e visível-vermelho na fertilização *in vitro* (FIV) de oócitos bovinos. Oócitos foram coletados a partir de ovários de abatedouro, selecionados e maturados *in vitro* durante 24 horas. Em seguida foram fertilizados com sêmen previamente tratado com quatro tempos de irradiação (30 segundos – L30; 60 segundos – L60; 120 segundos – L120; 180 segundos – L180) para cada tipo de laser, separadamente. Deu-se continuidade ao cultivo *in vitro* (CIV) por sete dias. Taxas de clivagem foram avaliadas no 3º dia de CIV, sendo semelhantes entre os grupos controle e tratados com os dois lasers (Infravermelho: L30 – 90,0% e C30 – 95,83%; L60 – 85,56% e C60 – 98,33%; L120 – 90,83% e C120 – 90,83%; L180 – 89,72% e C180 – 97,50%; e Visível: L30 – 82,96% e C30 – 85,61%; L60 – 82,10% e C60 – 82,53%; L120 – 80,48% e C120 – 82,44%; L180 – 83,53% e C180 – 87,15%). A produção de embriões ao sétimo dia de cultivo *in vitro* foi avaliada, não sendo observadas diferenças entre os grupos controle e tratados com ambos os lasers (Infravermelho: L30 – 49,45% e C30 – 57,50%; L60 – 41,95% e C60 – 46,67%;

L120 – 38,33% e C120 – 46,67%; L180 – 44,17% e C180 – 40,83% e Visível: L30 – 48,46% e C30 – 46,09%; L60 – 45,20% e C60 – 42,39%; L120 – 45,84% e C120 – 42,28%; L180 – 51,99% e C180 – 44,80%). A cinética no desenvolvimento embrionário ao sétimo dia de cultivo foi acompanhada, não sendo notadas diferenças estatísticas entre os grupos controle e tratados com ambos os lasers. Assim, as irradiações com os lasers infravermelho e visível em espermatozóides bovinos durante 30, 60, 120 e 180 segundos, aplicadas no momento da fertilização *in vitro*, não afetaram a taxa de clivagem ao terceiro dia de cultivo *in vitro*, bem como não alteraram a taxa de produção de embriões e sua cinética de desenvolvimento ao sétimo dia de cultivo *in vitro*.

Palavras-Chave: Espermatozóide bovino, Fertilização *in vitro*, Laser de baixa potência

1. Revisão de literatura

1.1 Capacitação espermática e reação acrossomal

O espermatozóide é uma célula complexa que se torna infértil quando um de seus fatores bioquímicos ou morfológicos é afetado, sendo que a combinação entre todos é necessária para sua integridade (MELO & HENRY, 1999).

Os processos de capacitação espermática e reação acrossomal (RA) no espermatozóide são fundamentais para a fertilização do oócito, pois é durante a capacitação que modificações bioquímicas e biofísicas ocorrem no gameta masculino fornecendo condições para transposição das barreiras oocitárias e responder aos estímulos indutores da RA que antecedem a fertilização. A RA acontece após a interação do espermatozóide com a zona pelúcida (ZP), é seguida pela liberação de uma série de enzimas acrossomais e outros constituintes que facilitam a sua penetração, expondo a zona equatorial

espermática que se funde ao oolema. Os mecanismos desencadeadores na transmissão de sinais envolvidos na capacitação e RA parecem estar relacionados a modificações no cálcio intracelular e outros íons, na fosforilação protéica, e na transferência lipídica e remodelamento fosfolipídico da membrana plasmática (MP) (BALDI et al., 2000).

Após a ejaculação, o espermatozóide permanece envolto pelos fatores decapacitantes (FD), moléculas que o mantêm no estado não capacitado, até sua passagem pelo trato reprodutor feminino, onde fluidos tubáricos acabam por removê-los (YANAGIMACHI, 1994). Dessa forma, o espermatozóide é conduzido com máxima habilidade fertilizante até o local de fertilização (FRASER, 1999). As modificações que ocorrem durante a capacitação concentram-se principalmente no metabolismo, na concentração de íons intracelulares, na fluidez e reorganização da membrana plasmática, no pH intracelular, na concentração de AMPc intracelular e na geração de EROs (VISCONTI et al., 1998; JHA et al., 2003; DE LAMIRANDE et al., 1997a). Tais modificações promovem alterações celulares como, por exemplo, a hiperativação espermática (intensificação da motilidade) e a fosforilação de proteínas pela tirosina, fundamentais para o processo de fertilização (YANAGIMACHI et al., 1994).

A RA é um processo fisiologicamente induzido pela interação entre o espermatozóide capacitado e a ZP do oócito, que é constituída por fusões múltiplas entre a membrana acrossomal externa e a membrana plasmática, resultando na liberação de enzimas acrossomais. Dessa forma, moléculas presentes na superfície da membrana acrossomal interna são expostas, permitindo sua fusão com o oolema. Somente os espermatozóides fisiologicamente capacitados conseguem sofrer RA, sendo, portanto, a capacitação e a RA, dois processos sequencialmente e funcionalmente interligados (BALDI et al., 2000).

1.2 Laser de baixa potência sobre os diferentes aspectos da fertilização

1.2.1. Concentrações de íons cálcio

Em diversas espécies de mamíferos, a elevação nas concentrações de cálcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ é fundamental para o processo de capacitação (YANAGIMACHI et al., 1994). A presença de FD na superfície do espermatozóide previne a elevação dos níveis de $[Ca^{2+}]_i$, por meio da ativação de bombas Ca^{2+} -ATPase, que expulsam o íon do meio intracelular. A remoção dos fatores, no entanto, leva à diminuição na atividade da bomba e a um aumento do $[Ca^{2+}]_i$ (ADEOYA-OSIGUWA & FRASER, 1996).

Durante a RA a presença do Ca^{2+} também se faz necessária, (YANAGIMACHI et al., 1994; WASSARMAN et al., 1999), pois seus estoques intracelulares e extracelulares modulam os primeiros mecanismos sinalizadores do processo (WALENSKY & SNYDER, 1995; DRAGILEVA et al., 1999; O'TOOLE et al., 2000). Com o progresso da RA, os grânulos de cálcio, que inicialmente estavam localizados na membrana acrossomal externa, associam-se a sítios de fusão com a membrana plasmática, anterior ao segmento equatorial do espermatozóide. Posteriormente, a localização dos íons torna-se ainda mais profunda, sugerindo seu papel no processo de fusão (WATSON et al., 1995).

A concentração de cálcio intracelular é garantida por canais seletivos para Ca^{2+} (potencial dependentes e receptor-operados) [GABALDI, 2004], sistemas de troca Ca^{2+}/H^+ e Na^+/Ca^{2+} (bombas de entrada para o Ca^{2+}) (FRASER et al. 1995) e bombas Ca^{2+} -ATPase (que agem expulsando o Ca^{2+}), presentes na membrana plasmática (FRASER & McDERMOTT, 1992; BREITBART et al., 1983), além de estoques pulsáteis de $[Ca^{2+}]_i$ (O'TOOLE et al. 2000), localizados nas mitocôndrias e retículo endoplasmático (GABALDI, 2004). Estas organelas são as maiores fontes intracelulares de Ca^{2+} , sendo sua liberação dependente de sinais elétricos, químicos ou anatômicos sobre bombas de cálcio, ativação de cátions e canais de cálcio, ou atividade de trocas iônicas (BOOTMAN et al., 2001; JANIS et al., 1987).

Os canais de cálcio são responsáveis pela entrada deste íon na célula em resposta à sinalização da membrana e podem ser classificados em dois grandes tipos: os canais voltagem-dependentes, que são ativados pela despolarização da membrana por estímulos químicos ou elétricos, e os canais receptor-operados, associados com a ativação de receptores por alterações químicas (BOOTMAN et al., 2001; JANIS et al., 1987; TRIGGLE, 1981), ambos são regulados pelo AMPc, dependente de proteína quinase (BOOTMAN et al., 2001; JANIS et al., 1987).

O efeito da luz laser no transporte de cálcio vem sendo estudado em diferentes modelos celulares (YOUNG et al., 1990; KARU, 1992), inclusive em células espermáticas (LUBART et al., 1997). A ação estimulatória do laser visível e infravermelho pode ser explicada como uma consequência de sua absorção por foto-sensibilizadores (elementos endógenos foto-sensíveis) da cadeia respiratória, citocromos e enzimas mitocondriais (FRIEDMAN et al., 1991; KARU, 1988). Ao serem irradiados, estes componentes tornam-se eletronicamente excitados e produzem espécies reativas do oxigênio (EROs) (BASU-MODAK & TYRREL, 1993; GROSSMAN et al., 1996), altamente oxidantes que estimulam a atividade redox da cadeia respiratória. Isto atinge o potencial de membrana através da membrana mitocondrial interna (MMI) e da produção de ATP, os quais podem estimular o influxo de cálcio para o interior das mitocôndrias, ou aumentar a atividade das bombas dependentes de ATPase presentes na MP, estimulando a mobilização de Ca^{2+} (LUBART et al., 1992; YOUNG et al., 1990).

Em experimentos utilizando lasers de He-Ne (630 nm) (LUBART et al., 1992) e diodo (780 nm) (LUBART et al., 1997) com variadas doses de energia sobre espermatozóides bovinos, observou-se uma aceleração no transporte de Ca^{2+} . A mesma metodologia foi aplicada para avaliação dos efeitos do laser sobre as mitocôndrias espermáticas, concluindo-se que a captação de Ca^{2+} foi acelerada por essas organelas, quando utilizadas baixas potências de He-Ne, porém inibidas com altas potências, não apresentando diferenças sobre a atividade da Ca^{2+} - ATPase presente na MP (BREITBART et al., 1996). Com relação à irradiação com laser diodo, a captação de Ca^{2+} pelas mitocôndrias foi inibida, mas a captação do

ion pela MP foi estimulada, efeito este aumentado pela presença de ATP (LUBART et al., 1997). Em espermatozoides de camundongos, a irradiação com laser visível (He-Ne 630 nm) estimulou os níveis de Ca^{2+} e o potencial de fertilização dessas células, sendo que o efeito da luz mostrou ser Ca^{2+} -dependente e parece estar ligado aos canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes, bem como os efeitos estimulatórios sobre os mecanismos mitocondriais de sinalização de Ca^{2+} (COHEN et al., 1998).

1.2.2. Fosforilação protéica

A fosforilação protéica é uma modificação pós-translacional de proteínas que ocorre em diversos processos celulares, sendo controlado pela atividade de quinases e fosfatases. No espermatozoide, processos fundamentais na fertilização, como a capacitação, a hiperativação e a RA, são regulados pela fosforilação de resíduos de seronina ou treonina e tirosina (URNER & SAKKAS, 2003).

Durante a capacitação, elevações crescentes nas $[\text{Ca}^{2+}]_i$, bicarbonato e peróxido de hidrogênio estimulam a adenil ciclase (AC) a produzir AMPc (BREITBART & NAOR, 1999), que por sua vez induz a proteína quinase A (PKA) a regular a atividade de tirosina quinases e fosfatases, resultando na fosforilação de uma série de proteínas (VISCONTI et al., 2002).

Na hiperativação, a fosforilação é fundamental, pois regula o padrão de motilidade iniciado durante a capacitação, garantindo ao espermatozoide a capacidade de penetração no oócito (MAHONY & GWATHMEY, 1999; NASSAR et al., 1999; SI & OKUNO, 1999). Proteínas denominadas ancoradoras de quinase A (AKAPs), localizadas no flagelo espermático, devem ter a tirosina fosforilada para que a hipermotilidade seja estabelecida (SI & OKUNO, 1999; CARRERA et al., 1996).

Outras proteínas necessárias na capacitação são as proteínas quinases mitógeno-ativadas (MAPK) que também são reguladas pela cascata da fosforilação. Elas são serina/treonina quinases, envolvidas na transmissão de

sinais em diversos mensageiros extracelulares e parecem exercer importante função na capacitação. Além de serem controladas por processos fosforilativos, as MAPK podem fosforilar proteínas que influenciam a fosforilação da tirosina (DE LAMIRANDE & GAGNON, 2002).

O mecanismo AC/AMPC/PKA, indutor da fosforilação protéica, está envolvido em outros aspectos do metabolismo espermático durante a capacitação. O remodelamento lipídico da membrana plasmática (HARRISON & MILLER, 2000) e o funcionamento de enzimas metabólicas (ROGERS & YANAGIMACHI, 1975) parecem depender da fosforilação de proteínas mediadas pela PKA.

Além da capacitação e hipermotilidade, a RA está entre os processos regulados pela fosforilação protéica (BRITO et al., 1989). Em hamsters, a incubação de espermatozóides com anticorpos antifosfotirosina, ou a inibição da atividade da tirosina quinase, impediram a penetração do gameta no oócito livre de ZP. Em espermatozóides humanos, acredita-se que a proteína fosforilada pela tirosina funcione como um possível receptor para ZP3 (NAZ et al., 1991). Na espécie bovina, o envolvimento da fosforilação da tirosina na RA foi confirmado após a ação de inibidores da tirosina quinase (LAX et al., 1994).

O AMPC, fundamental no mecanismo desencadeador da fosforilação, tem sua síntese dependente do ATP produzido pelo metabolismo da glicose e pela fosforilação oxidativa (TRAVIS et al., 2001; AITKEN et al., 1995; DE LAMIRANDE et al., 1998; URNER et al., 2001). O conjunto de reações de óxido-redução da OXPHOS, que ocorre nas mitocôndrias espermáticas, está ligado à ação de enzimas dependentes de NADPH (AITKEN et al., 1995; LECLERC et al., 1997).

Com relação à aplicação da bioestimulação do laser no processo de OXPHOS e síntese de ATP, estudos desenvolvidos por Karu (1998) sugerem que a luz é absorvida por citocromos da membrana mitocondrial interna, levando a um aumento na síntese de ATP (AMAT et al., 2002), por mecanismos ainda não completamente elucidados (KARU et al., 1995). Neste mesmo contexto, Corral-Baquéz et al. (2005) hipotetizaram que outras moléculas, como o próprio ATP, são capazes de responder à luz, direcionando-o para o ciclo de Krebs ou para a

fosforilação oxidativa. Diferentes tipos celulares irradiados com variados comprimentos de onda apresentaram elevações no potencial de membrana mitocondrial e no gradiente de prótons (PASSARELLA et al., 1994), mudanças nas propriedades ópticas das mitocôndrias, alterações nas reações ligadas à NADH-desidrogenase (PASSARELLA et al., 1983, FEDOSEYEVA et al., 1988, KARU ET AL., 1993) e aumento nas taxas de troca ADP/ATP (PASSARELLA et al., 1988) e na síntese de ATP (HILF et al., 1986; HERBERT et al., 1989; KARU et al., 1995).

1.2.3. Geração de Espécies Reativas do Oxigênio (EROs)

O metabolismo do oxigênio em espermatozóides resulta invariavelmente na produção de espécies reativas do oxigênio (EROs), que podem ter efeitos benéficos ou prejudiciais às funções espermáticas, dependendo do delicado balanço entre sua produção e eliminação. As EROs quando em excesso podem atacar a fluidez da membrana do espermatozóide, por meio da peroxidação de seus fosfolípidos e danificar o DNA nuclear, o que pode acarretar em declínio no número de células do ejaculado, associado à infertilidade e deterioração na qualidade do sêmen. A susceptibilidade do espermatozóide às EROs é ainda maior em relação às células somáticas devido à grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados presentes na membrana plasmática e às baixas concentrações de enzimas antioxidantes (COHEN et al., 1998).

No entanto, há evidências de que pequenas quantidades de EROs estejam envolvidas na capacitação e reação acrossomal (DE LAMIRANDE et al., 1997b; AITKEN et al., 1995; BIZE et al., 1991; GRIVEAU et al., 1994; DE LAMIRANDE & GAGNON, 1995a,b), sendo demonstrado que elas podem ser uns dos primeiros iniciadores da cascata de reações que culminam com a aquisição na habilidade fertilizante (DE LAMIRANDE et al., 1997b).

Sugere-se que os eventos celulares primários conseqüentes da irradiação com laser visível ou infravermelho, ocorrem nas mitocôndrias, após sua absorção por fotoreceptores primários, como a citocromo c oxidase e a NADPH-desidrogenase (KARU, 1988; KARU, 1999). Como conseqüência, acredita-se que

haja uma elevação nas taxas de fosforilação oxidativa, bem como do consumo de oxigênio, levando a uma maior produção de EROs (VEKSHIN, 1991), tendo o estresse oxidativo considerado como um dos eventos secundários provocados pela bioestimulação (KARU, 1988).

Estudos demonstraram que comprimentos de onda menores, localizados na luz visível estimulam a maior produção de EROs em relação aos lasers vermelhos (EICHLER et al., 2007). Em experimentos de Cohen et al. (1998), uma associação causal entre irradiação com luz laser, geração de EROs e função espermática foi demonstrada quando se utilizou antioxidantes, superóxido dismutase (SOD) e catalase, além de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) exógeno. No tratamento com SOD, o qual aumentou a produção de H_2O_2 , houve uma elevação na captação de Ca^{2+} e nas taxas de fertilização, porém, quando se adicionou catalase (decompositora de H_2O_2), os efeitos estimulatórios não foram notados, indicando que a presença de H_2O_2 poderia estar envolvida nos efeitos da irradiação, que realmente aumentam a sua produção pelo espermatozóide.

2. Material e métodos

2.1 Obtenção e maturação *in vitro* de oócitos bovinos

Os oócitos foram obtidos por aspiração folicular de ovários bovinos coletados em matadouro e em seguida, foram selecionados e maturados *in vitro* em meios apropriados durante 24 horas em estufa com atmosfera úmida a 38,5°C e 5% de CO_2 , de acordo com metodologia descrita no apêndice A.

2.2 Fertilização *in vitro* de oócitos bovinos

Os oócitos maturados *in vitro* foram fertilizados de acordo com protocolo descrito no apêndice C utilizando-se sêmen irradiado isoladamente com laser. As placas de cultivo contendo oócitos e espermatozóides foram retornados para

incubadora, permanecendo por mais 18-22 horas, em atmosfera úmida a 38,5°C e 5% de CO₂.

2.3 Equipamento de laser

Durante a fertilização *in vitro*, os espermatozóides foram submetidos à irradiação com laser. A descrição do equipamento de laser bem como dos padrões de irradiação utilizados neste e nos demais capítulos encontram-se detalhados no apêndice B.

2.4 Experimento III - Efeitos da irradiação de espermatozóides com laser infravermelho (780 nm) e visível (660 nm) sobre a clivagem, produção e cinética no desenvolvimento de blastocistos

O experimento avaliou os efeitos do laser infravermelho (780 nm) e do laser vermelho (660 nm) com diferentes tempos de irradiação na fertilização dos oócitos. Foram utilizados 1975 oócitos, sendo 928 destinados ao tratamento com laser infravermelho e 1047 ao laser visível. Após 24 horas de maturação, foi realizada a fertilização *in vitro*. Os oócitos foram retirados de suas gotas de maturação e lavados uma vez em meio de lavagem e outra em meio FIV. Após o aquecimento das palhetas de 0,5 mL contendo o sêmen congelado (37°C por 30 segundos), foi realizada a lavagem e diluição de acordo com apêndice C. Ajustada a diluição de acordo com a motilidade e concentração espermáticas, procedeu-se a deposição do sêmen nas microgotas correspondentes aos grupos: 30 segundos (**L30**), 60 segundos (**L60**), 120 segundos (**L120**) e 180 segundos (**L180**) de irradiação, dispostos sobre platina aquecedora, tendo a irradiação realizada individualmente para cada grupo. Grupos controle, respectivos aos tratados (**C30**, **C60**, **C120**, **C180**), foram submetidos à mesma manipulação, exceto pela irradiação e, em seguida, grupos de 20 a 25 oócitos foram transferidos para as gotas de fertilização. Após 18 a 22 horas de co-incubação de oócitos e espermatozóides em incubadora, os supostos zigotos tiveram suas células do

cumulus removidas por sucessivas pipetagens e foram transferidos para gotas contendo meio de cultivo *in vitro* (CIV), sendo devolvidos para a incubadora. Após 72 horas de cultivo (D3), foi realizado o primeiro “feeding”, com a remoção de 50 µL de meio das gotas de cultivo e acréscimo de 50 µL de meio CIV novo. Nesse momento, foi feita em cada grupo a contagem de estruturas que clivaram em relação ao total (taxa de clivagem). Posteriormente, realizou-se o 2º feeding no D5 (120 hpf) substituindo 50 µL de meio antigo com 50 µL de meio novo, suplementado com 0,5mM de glicose. Deu-se continuidade ao cultivo até o D7 (168 hpv), quando foi quantificado o número de embriões produzidos em cada grupo em relação ao total de estruturas presentes.

Ao ser feita a verificação da taxa de blastocistos, foi realizada também a classificação dos embriões de acordo com seus estádios de desenvolvimento, tendo como objetivo verificar se a irradiação com laser sobre os espermatozóides interfere na velocidade de desenvolvimento embrionário. De acordo com o estágio mais adiantado, as estruturas foram classificadas em Becl (blastocisto eclodido) > Bx (blastocisto expandido) > Bl (blastocisto) > Bi (blastocisto inicial).

2.5 Análise estatística

Os dados foram avaliados utilizando metodologia de quadrados mínimos, por meio do procedimento PROC GLM com o programa *Statistical Analysis System*, versão 9.1.3 (SAS, 1995). As variáveis foram transformadas de acordo a função raiz arco-seno das percentagens de estruturas clivadas e de embriões produzidos em relação ao total de oócitos destinados à maturação, e das proporções de blastocistos em suas diferentes categorias (Bi, Bl, Bx e Becl) em relação ao total de embriões produzidos conforme as recomendações de BANZATTO & KRONCA (2006). Posteriormente, as variáveis transformadas foram submetidas às análises de variância, e havendo significância nos resultados, os dados foram analisados com procedimento de comparações múltiplas, o Teste *t* de Student, sendo, posteriormente, as médias retornadas à escala original para apresentação dos resultados.

3. Resultados

Os resultados obtidos em relação à clivagem e à produção de embriões nos grupos controle (C30, C60, C120, C180) e tratados (L30, L60, L120, L180) com os lasers infravermelho e visível estão descritos, respectivamente, na Tabela 4 e Figura 10, e Tabela 5 e Figura 11. Os resultados quantificados com relação à cinética de desenvolvimento dos embriões encontram-se detalhados nas Tabelas 6 a 9 e Figura 12.

Tabela 4. Porcentagem de estruturas clivadas *in vitro* com 72 hpf¹, em relação ao total de oócitos bovinos destinados à maturação.

Tempos de Irradiação	Porcentagem de estruturas clivadas (%* ± Erro Padrão)			
	Laser Infravermelho		Laser Visível	
	C	L	C	L
30 seg.	95,83 ± 1,54 ^a	90,00 ± 3,65 ^a	85,61 ± 3,91 ^a	82,96 ± 4,58 ^a
60 seg.	98,33 ± 1,67 ^a	85,56 ± 4,38 ^a	82,53 ± 4,26 ^a	82,10 ± 3,05 ^a
120 seg.	90,83 ± 4,36 ^a	90,83 ± 3,52 ^a	82,44 ± 5,41 ^a	80,48 ± 6,25 ^a
180 seg.	97,50 ± 2,5 ^a	89,72 ± 2,99 ^a	87,15 ± 2,22 ^a	83,53 ± 6,25 ^a

¹hpf = horas pós-fertilização

*Valor calculado em função do número total de oócitos maturados *in vitro*.

^{a,b}Letras iguais entre colunas na mesma linha não diferem entre si.

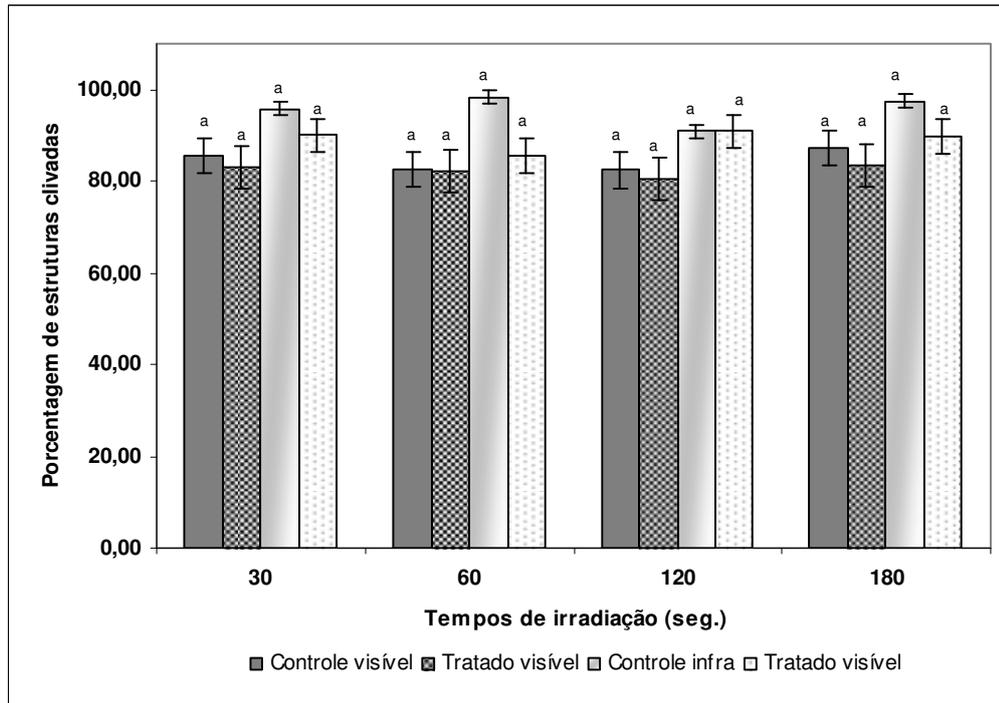


Figura 10. Porcentagem de estruturas clivadas *in vitro* com 72 hpf, em relação ao total de oócitos bovinos destinados à maturação.

Os oócitos irradiados com laser infravermelho não apresentaram diferenças estatísticas significativas na produção de clivados ($p > 0,05$), apesar de haver taxas de produção numericamente menores nos grupos tratados L30, L60 e L180 (L30 – 90,0%, L60 – 85,56%, L180 – 89,72%) em relação aos grupos controle respectivos (C30 – 95,83%; C60 – 98,33% e C180 – 97,50%).

Os grupos tratados com laser visível também apresentaram médias de produções de estruturas clivadas semelhantes ($p > 0,05$) às médias de seus respectivos grupos controle. No entanto, foi observada nos grupos tratados L30, L120 e L180, as taxas de produção de clivados numericamente menores (L30 – 82,96%; L120 – 80,48% e L180 – 83,53%) em relação aos respectivos grupos controle não irradiados (C30 – 85,61%; C120 – 82,44% e C180 – 87,15%).

Tabela 5. Porcentagem de embriões produzidos *in vitro* ao sétimo dia de cultivo, em relação ao total de oócitos destinados à maturação.

Tempos de Irradiação	Produção de embriões ao D7 [†] (%* ± Erro Padrão)			
	Laser Infravermelho		Laser Visível	
	C	L	C	L
30 seg.	57,50 ± 4,88 ^a	49,45 ± 4,88 ^a	46,09 ± 4,52 ^a	48,46 ± 4,52 ^a
60 seg.	46,67 ± 4,88 ^a	41,95 ± 4,88 ^a	42,39 ± 4,52 ^a	45,20 ± 4,52 ^a
120 seg.	46,67 ± 4,88 ^a	38,33 ± 4,88 ^a	42,28 ± 4,52 ^a	45,84 ± 4,52 ^a
180 seg.	40,83 ± 4,88 ^a	44,17 ± 4,88 ^a	44,80 ± 4,52 ^a	51,99 ± 4,52 ^a

[†]D7 = sétimo dia de cultivo *in vitro*.

*Valor calculado em função do número total de oócitos maturados *in vitro*.

^{a,b}Letras iguais entre colunas na mesma linha não diferem entre si.

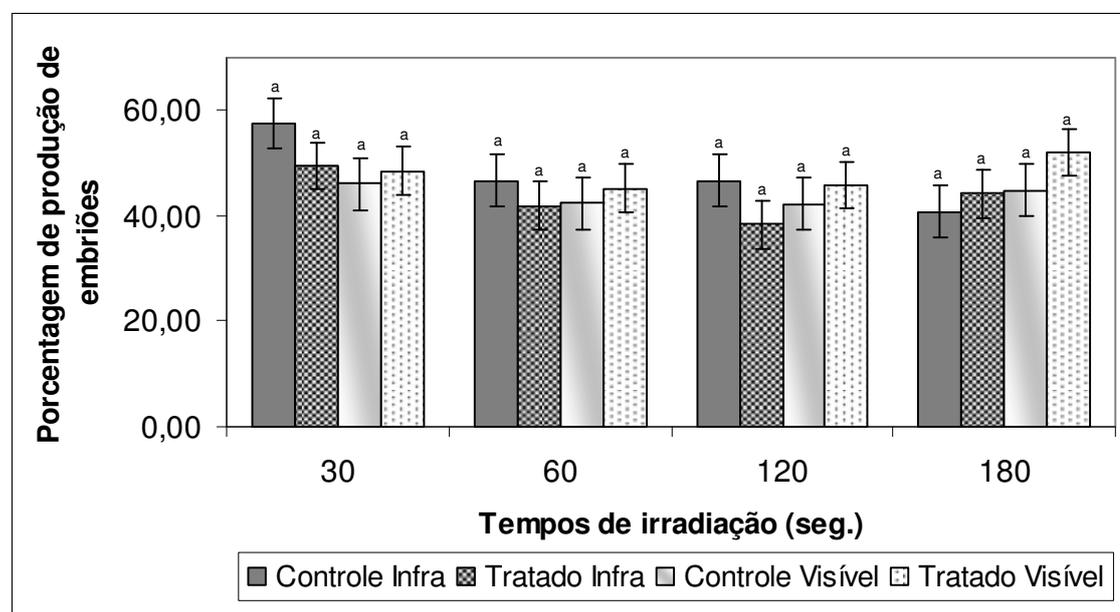


Figura 11. Porcentagem de embriões produzidos *in vitro* ao sétimo dia de cultivo, em relação ao total de oócitos destinados à maturação.

Os oócitos irradiados com laser infravermelho não apresentaram diferenças estatísticas significativas na produção embrionária ($p > 0,05$), apesar de haver taxas de produção numericamente menores nos grupos mantidos por menor tempo sob irradiação (L30 – 49,45%; L60 – 41,95%; L120 – 38,33%) em relação aos respectivos grupos controle (C30 – 57,5%; C60 – 46,67%; C120 – 46,67%). No grupo com maior tempo de irradiação (180 seg.), houve taxa de produção embrionária numericamente maior (L180 – 44,16%) em relação ao seu grupo

controle correspondente (C180 – 40,83%). Os grupos tratados com laser visível também apresentaram médias de produções de blastocistos semelhantes ($p > 0,05$) às médias de seus respectivos grupos controle. No entanto, foram observadas nos grupos tratados, taxas de produção de embriões (L30 – 48,46%; L60 – 45,20%; L120 – 45,84% e L180 – 51,99%) numericamente maiores em relação aos seus respectivos grupos não irradiados (C30 – 46,09%; C60 – 42,39%; C120 – 42,28% e C180 – 44,80%).

Tabela 6. Porcentagem de blastocistos iniciais produzidos *in vitro* ao sétimo dia de cultivo, em relação ao total de embriões produzidos.

Tempos de Irradiação	Produção de Blastocistos Iniciais ao D7 ¹ (%* ± Erro Padrão)			
	Laser Infravermelho		Laser Visível	
	C	L	C	L
30 seg.	38,43 ± 8,18 ^a	51,42 ± 7,47 ^a	30,21 ± 6,91 ^a	33,87 ± 6,91 ^a
60 seg.	34,17 ± 9,14 ^a	25,69 ± 7,47 ^a	28,62 ± 6,91 ^a	28,44 ± 6,91 ^a
120 seg.	41,67 ± 9,14 ^a	27,59 ± 7,47 ^a	48,27 ± 6,91 ^a	45,06 ± 6,91 ^a
180 seg.	37,78 ± 9,14 ^a	37,87 ± 7,47 ^a	35,76 ± 6,91 ^a	50,50 ± 6,91 ^a

¹D7 = sétimo dia de cultivo *in vitro*.

*Valor calculado em função do número total de oócitos maturados *in vitro*.

^{a,b}Letras iguais entre colunas na mesma linha não diferem entre si.

Tabela 7. Porcentagem de blastocistos produzidos *in vitro* ao sétimo dia de cultivo, em relação ao total de embriões produzidos.

Tempos de Irradiação	Produção de Blastocistos ao D7 ¹ (%* ± Erro Padrão)			
	Laser Infravermelho		Laser Visível	
	C	L	C	L
30 seg.	31,56 ± 7,29 ^a	33,97 ± 6,65 ^a	18,95 ± 6,16 ^a	31,49 ± 6,16 ^a
60 seg.	38,47 ± 8,15 ^a	45,10 ± 6,65 ^a	22,37 ± 6,16 ^a	40,26 ± 6,16 ^a
120 seg.	37,50 ± 8,15 ^a	45,65 ± 6,65 ^a	18,96 ± 6,16 ^b	27,05 ± 6,16 ^{a,b}
180 seg.	30,00 ± 8,15 ^a	35,66 ± 6,65 ^a	29,57 ± 6,16 ^a	22,49 ± 6,16 ^a

¹D7 = sétimo dia de cultivo *in vitro*.

*Valor calculado em função do número total de oócitos maturados *in vitro*.

^{a,b}Letras iguais entre colunas na mesma linha não diferem entre si.

Tabela 8. Porcentagem de blastocistos expandidos produzidos *in vitro* ao sétimo dia de cultivo, em relação ao total de embriões produzidos.

Tempos de Irradiação	Produção de Blast. Expandidos ao D7 ¹ (%* ± Erro Padrão)			
	Laser Infravermelho		Laser Visível	
	C	L	C	L
30 seg.	16,61 ± 5,57 ^{a,b}	10,31 ± 5,08 ^b	31,20 ± 4,71 ^a	26,27 ± 4,71 ^a
60 seg.	18,68 ± 6,23 ^a	29,21 ± 5,08 ^a	35,08 ± 4,71 ^a	19,69 ± 4,71 ^a
120 seg.	14,58 ± 6,23 ^a	25,37 ± 5,08 ^a	21,70 ± 4,71 ^a	17,26 ± 4,71 ^a
180 seg.	27,22 ± 6,23 ^a	21,78 ± 5,08 ^a	19,66 ± 4,71 ^a	16,73 ± 4,71 ^a

¹D7 = sétimo dia de cultivo *in vitro*.

*Valor calculado em função do número total de oócitos maturados *in vitro*.

^{a,b}Letras iguais entre colunas na mesma linha não diferem entre si.

Tabela 9. Porcentagem de blastocistos eclodidos produzidos *in vitro* ao sétimo dia de cultivo, em relação ao total de embriões produzidos.

Tempos de Irradiação	Produção de Blast. Eclodidos ao D7 ¹ (%* ± Erro Padrão)			
	Laser Infravermelho		Laser Visível	
	C	L	C	L
30 seg.	13,41 ± 4,28 ^{a,b}	4,29 ± 3,91 ^b	19,63 ± 3,62 ^a	8,36 ± 3,62 ^{a,b}
60 seg.	8,68 ± 4,78 ^{a,b}	0,00 ± 3,91 ^b	13,92 ± 3,62 ^a	11,62 ± 3,62 ^a
120 seg.	6,25 ± 4,78 ^a	1,39 ± 3,91 ^a	11,07 ± 3,62 ^a	10,62 ± 3,62 ^a
180 seg.	5,00 ± 4,78 ^a	4,70 ± 3,91 ^a	15,01 ± 3,6	10,27 ± 3,62 ^a

¹D7 = sétimo dia de cultivo *in vitro*.

*Valor calculado em função do número total de oócitos maturados *in vitro*.

^{a,b}Letras iguais entre colunas na mesma linha não diferem entre si.

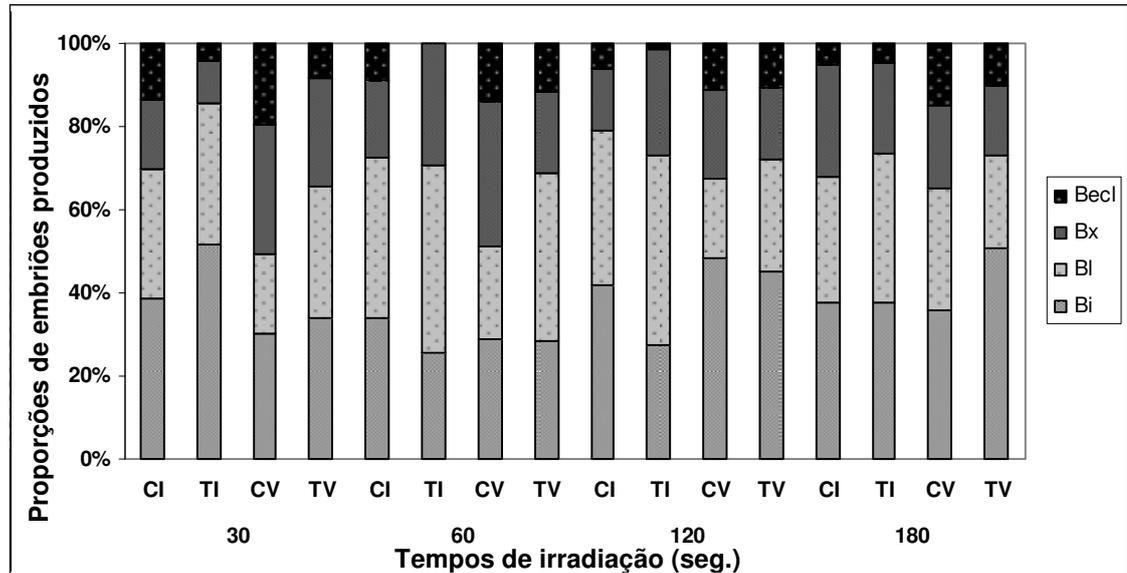


Figura 12. Porcentagem de embriões bovinos produzidos ao sétimo dia de cultivo *in vitro* e avaliados quanto à cinética de desenvolvimento. Becl – blastocisto eclodido; Bx – blastocisto expandido; BI – blastocisto; Bi – blastocisto inicial.

Com relação à proporção de blastocistos iniciais, os grupos tratados com laser infravermelho apresentaram médias ($p>0,05$) semelhantes (L30 – 51,42%; L60 – 25,69%; L120 – 27,59%; L180 – 37,87%) aos respectivos grupos controle (C30 – 38,43%; C60 – 34,17%; C120 – 41,67%; C180 – 37,78%). Os resultados referentes à proporção de blastocistos no tratamento com laser infravermelho apresentaram médias ($p>0,05$) semelhantes entre os grupos tratados (L30 – 33,97%; L60 – 45,10%; L120 – 45,65; e L180 – 35,66%) e seus respectivos grupos controle (C30 – 31,56%; C60 – 38,47%; C120 – 37,50% e C180 – 30,0%). Os resultados relacionados à proporção de blastocistos expandidos mostram que os grupos tratados com laser infravermelho apresentaram médias ($p>0,05$) semelhantes (L30 – 10,31%; L60 – 29,21%; L120 – 25,37%; L180 – 21,78%) aos respectivos grupos controle (C30 – 16,61%; C60 – 18,68%; C120 – 14,58%; C180 – 27,22%). Os resultados referentes à proporção de blastocistos eclodidos mostram que os grupos tratados com laser infravermelho também apresentaram médias ($p>0,05$) semelhantes (L30 – 4,29%; L60 – 0%; L120 – 1,39%; L180 –

4,70%) aos respectivos grupos controle (C30 – 13,41%; C60 – 8,68%; C120 – 6,25%; C180 – 5,0%).

Com relação à proporção de blastocistos iniciais, os grupos tratados com laser visível apresentaram médias ($p>0,05$) semelhantes (L30 – 33,87%; L60 – 28,44%; L120 – 45,06%; L180 – 50,50%) aos respectivos grupos controle (C30 – 30,21%; C60 – 28,62%; C120 – 48,27%; C180 – 35,76%). Os resultados referentes à média de proporção de blastocistos mostram que os grupos tratados com laser visível também apresentaram médias ($p>0,05$) semelhantes (L30 – 31,49%; L60 – 40,26%; L120 – 27,05%; L180 – 22,49%) aos respectivos grupos controle (C30 – 18,95%; C60 – 22,37%; C120 – 18,96%; C180 – 29,57%). Com relação à produção de blastocistos expandidos, os grupos tratados com laser visível não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p>0,05$) na proporção de Bx (L30 – 26,27%; L60 – 19,69%; L120 – 17,26%; L180 – 16,73%) em relação aos seus respectivos controles (C30 – 31,20%; C60 – 35,08%; C120 – 21,70%; C180 – 19,66%). Os resultados referentes à proporção de blastocistos eclodidos mostram que os grupos tratados não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p>0,05$) (L30 – 8,36%; L60 – 11,62%; L120 – 10,62%; L180 – 10,27%) em relação aos seus respectivos controles (C30 – 19,63%; C60 – 13,92%; C120 – 11,07%; C180 – 15,01%).

4. Discussão

4.1 Experimento III - Efeitos da irradiação de espermatozoides com laser infravermelho (780 nm) e visível (660 nm) sobre a clivagem, produção e cinética no desenvolvimento de blastocistos

Neste experimento, foram consideradas clivadas as estruturas que apresentaram duas ou mais células ao terceiro dia de cultivo *in vitro* (72 hpf), e

suas porcentagens foram calculadas em relação ao total de oócitos destinados à maturação *in vitro*. Nossos resultados indicaram que não houve diferenças estatísticas significativas nas taxas de clivagem entre os grupos irradiados com os lasers infravermelho e visível e seus respectivos controles nos tratamentos com 30, 60, 120 e 180 segundos, corroborando com os dados obtidos por Cohen et al. (1998), nos quais irradiações com diodo laser (780 nm, 25 mW) em espermatozóides murinos não alteraram as taxas de fertilização.

O presente trabalho demonstrou que os espermatozóides irradiados com laser visível nos tempos 30, 120 e 180 seg. apresentaram, numericamente, uma discreta redução na taxa de clivagem, quando comparados aos grupos controle. Estes resultados contrastam com os dados obtidos no estudo desenvolvido por Cohen et al. (1998), os quais mostraram que as taxas de fertilização após a irradiação de espermatozóides murinos com laser de HeNe (630 nm, 13 mW) foram elevadas em relação as dos grupos não irradiados, já com um minuto de tratamento, apresentando uma superioridade de 37% e 32% respectivamente nos grupos irradiados durante 5 e 10 minutos, quando comparados aos grupos controle. O aumento na capacidade fertilizante do espermatozóide foi interpretado no estudo como conseqüência do aumento nos níveis de cálcio intracelular, provavelmente por envolvimento de moléculas de H_2O_2 geradas pela irradiação.

Foram ainda observados neste experimento que a diminuição numérica nas taxas de clivagem após as irradiações com ambos os lasers, não foram dose-dependentes, já que os grupos tratados durante 120 seg. com laser infravermelho e 60 seg. com laser visível não tiveram suas taxas de clivagem alteradas, ou mesmo uma diminuição nos índices de estruturas clivadas nos demais grupos, uma vez que não foi notada uma elevação proporcional conforme a elevação do tempo de irradiação.

Ao serem avaliadas as taxas de produção de embrionária, notamos que não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos tratados com os lasers infravermelho e visível e seus respectivos grupos controle nos diversos tempos de tratamento adotados. Embora se tenha observado resultados numericamente

inferiores nos grupos irradiados com laser infravermelho durante 30, 60 e 120 seg. ($37,5\text{J}/\text{cm}^2$, $75\text{J}/\text{cm}^2$ e $150\text{J}/\text{cm}^2$) e numericamente superiores no grupo irradiado durante 180 seg. ($225\text{J}/\text{cm}^2$), não foram constatadas diferenças estatísticas quando comparadas aos respectivos grupos controle. Comparativamente, o trabalho desenvolvido por Lubart et al. (1992), relata que espermatozóides bovinos irradiados com laser infravermelho (diodo, 780 nm, 40 mW, 2 a 30 J cm^{-2}) tiveram a captação de cálcio acelerada quando foram utilizadas doses de energia mais baixas, sendo o máximo do transporte promovido após irradiação de 3 J cm^{-2} . Quando estas passaram a ser elevadas, a captação de cálcio foi proporcionalmente diminuída. Em nosso experimento, observa-se que as menores taxas numéricas de embriões foram conseguidas com as menores densidades de energia aplicadas, e que foram elevadas quando utilizada a maior densidade. Pode-se inferir, neste experimento, que o laser somente foi capaz de ativar a captação de cálcio quando utilizado em maiores densidades de energia, o que gerou elevação nas concentrações intracelulares dos íons, fundamental para o processo de capacitação (YANAGIMACHI et al., 1994; ADEOYA-OSIGUWA & FRASER, 1996) e reação acrossomal (YANAGIMACHI et al., 1994; WASSARMAN et al., 1999; WALENSKY & SNYDER, 1995; DRAGILEVA et al., 1999; O'TOOLE et al., 2000), refletindo em maiores taxas numéricas de embriões neste grupo.

Ao analisar os resultados referentes à utilização do laser visível, notou-se uma produção embrionária numericamente maior em todos os grupos de tratamento em relação aos respectivos grupos controle, apesar da ausência de diferenças estatísticas significativas. Tal observação pode estar associada a um efeito benéfico dose-dependente no tratamento com laser visível, já que, numericamente, as taxas de produção embrionária foram proporcionalmente aumentadas conforme se elevaram os tempos de irradiação. Apesar de não haver diferenças estatísticas na produção embrionária entre grupos tratados e controle, estes dados estão de acordo com os resultados obtidos por Lubart et al. (1992), no que se refere aos efeitos benéficos do laser visível em espermatozóides, já que dados desta literatura relataram uma maior captação de cálcio em

espermatozóides após sua irradiação com laser visível (He-Ne, 632 nm, 35 e 10 mW, 2 a 30 J cm⁻²). No entanto, o efeito favorável dose-dependente observado em nosso experimento não foi relatado no trabalho, já que a maior captação de cálcio foi conseguida quando utilizadas baixas densidades de energia, sendo seu máximo obtido com densidades de 6 a 18 J cm⁻², mas quando foram aplicadas densidades maiores que 18 J cm⁻², houve declínio no transporte do íon. Contrariamente a este trabalho, Ocaña-Quero et al. (1997) relataram que a irradiação de espermatozóides bovinos com laser visível (He-Ne, 632 nm, 10 mW, 0,08 W cm⁻², 2 a 16 J cm⁻², 5 a 40 seg.) levou a maiores taxas de reação acrossomal e a menores índices de mortalidade espermática quando utilizadas densidades de energia mais elevadas (8 a 16 J cm⁻²). Em nosso trabalho, os melhores índices de produção embrionária obtidos nos grupos tratados em relação ao controle, quando utilizadas maiores doses de energia, podem ter ocorrido possivelmente devido à associação de fatores como a aceleração no transporte do cálcio, às maiores taxas de reação acrossomal e às menores de mortalidade espermática, os quais, associados, podem ter estimulado o processo de fertilização, acarretando em maiores taxas de embriões produzidos ao sétimo dia de cultivo *in vitro*.

Ao relacionar as taxas de clivagem e produção embrionária obtidas no tratamento com laser infravermelho, observou-se que somente os grupos tratados durante 30 e 60 seg., apresentaram, numericamente, menores taxas em relação ao controle, tanto de estruturas clivadas quanto de embriões, porém sem diferenças estatísticas. Já no grupo irradiado durante 120 seg., foram notados idênticos índices de clivagem, porém menores taxas numéricas de embriões em relação ao controle. O grupo tratado durante 180 seg., por sua vez, apresentou, numericamente, uma menor taxa de clivagem, porém uma superioridade na produção embrionária em relação ao respectivo controle. Sabe-se que em condições *in vitro*, o sêmen influencia as taxas de clivagem (KURTU et al., 1996), e que embriões bovinos que clivam mais cedo alcançam mais facilmente o estágio de blastocisto em relação àqueles com clivagem tardia (MILLER et al., 1994;

PLANTE & KING, 1992; VAN SOON et al., 1992). No entanto, baseados nos dados deste experimento, não se pode afirmar que a elevação ou redução nas diferenças numéricas nas taxas de clivagem dos grupos tratados em relação ao controle, foram posteriormente acompanhadas da elevação ou redução na produção embrionária, em todos os tempos de tratamento adotados com o laser infravermelho. Dessa forma, pode-se inferir que eventos ocorrendo posteriormente ao terceiro dia de cultivo *in vitro*, provavelmente independentes dos processos de fertilização e clivagem, possam ter contribuído na variação das taxas de produção embrionária dos diferentes grupos. Dentre os eventos, pode-se citar a transcrição de RNAs mensageiros (NIEMANN & WRENZYCKI, 1999) e a capacidade de síntese protéica (KURAN et al., 2001).

Com relação ao tratamento com o laser visível, observou-se que uma superioridade numérica nos grupos irradiados aos 30, 120 e 180 seg. em relação aos respectivos grupos controle, bem como uma correlação positiva na taxa de produção embrionária, porém sem diferenças estatísticas. No grupo tratado durante 60 seg., notaram-se maiores índices de produção embrionária em relação ao controle, mas taxas iguais de estruturas clivadas. Por fim, embora sem haver diferenças estatísticas, observou-se uma relação positiva entre as taxas de clivagem e a produção embrionária quando da utilização do laser visível em espermatozóides.

De acordo com as proporções de Bi, B1, Bx e Becl em relação ao total de embriões produzidos ao sétimo dia de CIV, notou-se que as irradiações com o laser infravermelho não alterou estatisticamente a cinética de desenvolvimento embrionário dos grupos tratados em relação aos grupos controle. No entanto, observamos que o grupo irradiado durante 30 seg. apresentou proporções de Bi e B1 numericamente maiores em relação ao controle, porém inferiores proporções de Bx e Becl em relação ao controle. Apesar de ser identificado um provável retardo no desenvolvimento dos embriões no grupo tratado durante 30 seg., não podemos afirmar que houve um efeito deletério dose-dependente da irradiação com laser

infravermelho, uma vez que, conforme foram elevados os tempos de tratamento, o efeito deletério não foi intensificado, sequer persistiu.

Com relação à irradiação com laser visível, apesar da ausência de diferenças estatísticas, observou-se que grupos tratados durante 30 e 180 seg. apresentaram maiores proporções de Bi em relação aos grupos controle, além de menores proporções de Bx e Becl. em relação aos controle. Apesar deste efeito numericamente prejudicial do laser visível sobre a cinética de desenvolvimento embrionário nos grupos tratados durante 30 e 180 seg. em relação aos grupos controle, não podemos inferir que ele foi dose-dependente, pois os grupos tratados durante 60 e 120 seg. não mostraram, numericamente, esta evidência quando comparados aos grupos controle. Apesar de não termos avaliado o momento da primeira clivagem e sim o total de estruturas clivadas ao terceiro dia de cultivo *in vitro*, pode-se inferir que, caso o laser possa interferir nos processos envolvidos na fertilização, acelerando o momento da primeira clivagem, pode também aumentar a cinética de desenvolvimento embrionário. Em bovinos, a primeira clivagem acontece em bovinos aproximadamente de 26 a 32 horas após a fertilização *in vitro* (BARNES & EYESTONE, 1990; BARNES & FIRST, 1990; XU et al., 1987), e tem sido correlacionada com a velocidade de desenvolvimento embrionário posterior (LUNDIN et al., 2001).

5. Conclusões

Diante dos resultados obtidos nos experimentos, pode-se concluir que:

- As irradiações com laser semiconductor operando em 780 nm (infravermelho) e 660 nm (visível) em espermatozóides durante 30, 60, 120 e 180 segundos não alteraram as taxas de clivagem ao terceiro dia de cultivo *in vitro*.
- A produção embrionária ao sétimo dia de cultivo *in vitro* não foi afetada após a irradiação de espermatozóides com o laser infravermelho (semiconductor)

operando em 780 nm) e visível (semicondutor operando em 660 nm) durante 30, 60, 120 e 180 segundos, ao terceiro dia de cultivo *in vitro*.

- O tratamento de espermatozóides com laser semicondutor operando em 780 nm (infravermelho) e 660 nm (visível) durante 30, 60, 120 e 180 segundos não alterou a cinética de desenvolvimento embrionário ao sétimo dia de cultivo *in vitro*.

REFERÊNCIAS

ADEOYA-OSIGUWA, S.A.; FRASER, L.R. Evidence for Ca²⁺-dependent ATPase activity, stimulated by decapacitation factor and calmodulin, in mouse sperm. **Molecular Reproduction and Development**, v.44, p.111–120, 1996.

AITKEN, R.J.; PATERSON, M.; FISHER, H.; BUCKINGHAM, D.W.; VAN DUIN, M. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. **Journal of Cell Science**, v.108 p.2017–2025, 1995.

AMAT, A.; NICOLAU, R.; RIGAU, J.; TOMÀS, J. Energy light interaction with molecules with high energy bond. In: **Proceedings of XVIII Congresso Brasileiro de engenharia biomédica**, San Jose dos Campos, Sao Paulo, 9–12 September 2002, ALB-65–2, 2002, p.91.

BALDI, E.; LUCONI, M.; BONACCORSI, L.; MURATORI, M.; FORTI, G. Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. **Frontiers in Bioscience**, v.5, p.110-123, 2000.

BANZATTO, D.A.; KRONCA, S.N. **Experimentação Agrícola**. Ed. Funep, Jaboticabal, FCAV-UNESP, 4^a ed. p.237, 2006.

BARNES, F.L.; EYESTONE, W.H. Early cleavage and the maternal zygotic transition in bovine embryos. **Theriogenology**, v.33, p.141 – 152, 1990.

BARNES, F.L.; FIRST, N.L. Embryonic transcription in *in vitro* cultured bovine embryos. **Molecular and Reproduction Development**, v.29, p. 117- 123, 1990.

BASU-MODAK, S.; TYRREL, R.M. Singlet oxygen: a primary effector in the ultraviolet A near-visible light induction of the human heme oxygenase gene. **Cancer Research**, v.53, p.4505–4510, 1993.

BAVISTER, B.D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. **Human Reproduction Update**, v.1, p.91-148, 1995.

BIZE, I.; SANTANDER, G.; CABELLO, P.; DRISCOLL, D.; SHARPE, C. Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.44, p.398-403, 1991.

BOOTMAN, M.D.; COLLINS, T.J.; PEPPIATTI, C.M.; PROTHERO, L.S.; MACKENZIE, L.; DE SMET, P.; TRAVERS, M.; TOVEYS, S.C.; SEO, J.T.; BERRIDGE, M.J.; CICCOLINI, F.; LIPP, P. Calcium signaling – an overview. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v.12, p.3-10, 2001.

BREITBART, H.; LEVINSHAL, T.; COHEN, N.; FRIEDMANN, H.; LUBART, R. Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membrane irradiated at 633 nm (HeNe laser). **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v.34, p.117–121, 1996.

BREITBART, H.; NAOR, Z. Protein kinases in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. **Reviews of Reproduction**, v.4, p.151–159, 1999.

BREITBART, H.; STERN, B.; RUBINSTEIN, S. Calcium transport and Ca²⁺-ATPase activity in ram spermatozoa plasma membrane vesicles. **Biochimica et Biophysica ACTA**, v.728, p.349–355, 1983.

BRITO, M.; FIGUERO, A.J.; MALDONADO, E.U.; VERA, J.C.; BURZIO, L.O. The major component of the rat sperm fibrous sheath is a phosphoprotein. **Gamete Research**, v.22, p.205-217, 1989.

BYRNE, A.T.; SOUTHGATE, J.; BRISON, D.R.; LEESE, H.J. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.117, p.97–105, 1999.

CARRERA, A.; MOOS, J.; NING, X.P.; GERTON, G.L.; TESARIK, J.; KOPF, G.S.; MOSS, S.B. Regulation of protein tyrosine phosphorylation in human sperm by a calcium/calmodulin-dependent mechanism: identification of A kinase anchor proteins as major substrates for tyrosine phosphorylation. **Developmental Biology**, v.180, p.284-296, 1996.

COHEN, N.; LUBART, R.; RUBINSTEIN, S.; BREITBART, H. Light irradiation of mouse spermatozoa: stimulation of *in vitro* fertilization and calcium signals **Photochemistry and Photobiology**, v.68, n.3, p.407-413, 1998.

CORRAL-BAQUÉS, M.I.; RIGAU, T.; RIVERA, M.; RODRÍGUEZ, J.E.; J. RIGAU. Effect of 655-nm diode laser on dog sperm motility. **Lasers in Medical Science**, v.20, p.28–34, 2005.

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

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Increased production of intra- and extracellular superoxide anion by capacitating human spermatozoa. **Journal of Andrology** v.1, p.54, 1995b.

DE LAMIRANDE, E.; LECLERC, P.; GAGNON, C. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. **Molecular Human Reproduction**, v.3, p.175–194, 1997a.

DE LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v.2, p.48-54, 1997b.

DE LAMIRANDE, E.; HARAKAT, A.; GAGNON, C. Human sperm capacitation induced by biological fluids and progesterone, but not by NADH or NADPH, is associated with the production of superoxide anion. **Journal of Andrology**, v.19, p.215–225, 1998.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. The extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway is involved in human sperm function and modulated by the superoxide anion. **Molecular Human Reproduction**, v.8, p.124–135, 2002.

DRAGILEVA, E.; RUBINSTEIN, S.; BREITBART, H. Intracellular Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase regulates calcium influx and acrosomal exocytosis in bull and ram spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.61, p.1226-34, 1999.

EICHLER, M.; LAVI, R.; FRIEDMANN, H.; SHAINBERG, A.; LUBART, R. Red light-induced redox reactions in cells observed with TEMPO. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.25, n.3, p.170-174, 2007.

ENRIGHT, B.P.; LONERGAN, P.; DINNYES, A.; FAIR, T.; WARD, F.A.; YANG, X.; BOLAND, M.P. Culture of in vitro produced bovine zygotes *in vitro* vs. *in vivo*: implications for early embryo development and quality. **Theriogenology**, v.54, p.659–673, 2000.

FEDOSEYEVA, G.S.; KARU, T.I.; LYAPUNOVA, T.S.; POMOSHNIKOVA, N.A.; MEISSEL, M.N. The activation of yeast metabolism with He-Ne laser. II. Activity of enzymes of oxidative and phosphorus metabolism. **Lasers in the Life Sciences**, v.2, p.147-154, 1988.

FLEMING, T.P.; SHETH, B.; FESENKO, I. Cell adhesion in the preimplantation mammalian embryo and its role in trophectoderm differentiation and blastocyst morphogenesis. **Frontiers in Bioscience**, v.6, p.1000-1007, 2001.

FRASER, L.R. Mechanisms regulating capacitation and the acrosome reaction. In: **Human sperm acrosome reaction**. Montrouge: Eds: John Libbey Eurotext Ltda, v. 236, p.17-33, 1995.

FRASER, L.R. New insights into possible causes of male infertility. **Human Reproduction**, v.14, p.38-46, 1999.

FRASER, L.R.; MCDERMOTT, C.A. Ca²⁺-related changes in the mouse sperm capacitation state: a possible role for Ca²⁺-ATPase. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.96, p.363-377, 1992.

FRIEDMANN, H.; LUBART, R.; LAULICHT, I. A possible explanation of laser-induced stimulation. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v.11, p.87-95, 1991.

GABALDI, S. H. **Efeito de bloqueadores de canais de íons cálcio sobre espermatozoides e oócitos de hamsters fecundados *in vivo* e *in vitro***. 204f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

GONZALES, D.S.; BAVISTER, B.D. Zona pellucida escape by hamster blastocysts *in vitro* is delayed and morphologically different compared with zona escape *in vivo*. **Biology of Reproduction**, v.52, p.470-480, 1995.

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

GRIVEAU, J. F., RENARD, P.; LE, LE LANNOU, I. An *in vitro* promoting role of human sperm capacitation for hydrogen peroxide. **International Journal of Andrology**, v.17, p.300-307, 1994.

GROSSMAN, N.; SCHNEID, H.; REUVENI, H.; HALEVY, S.; LUBART, R. Enhanced proliferation of keratinocyte cultures following low power HeNe (633 nm) laser irradiation. Involvement of reactive oxygen species. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, 1996.

HARDY, K. Apoptosis in the human embryo. **Reviews of Reproduction**, v.4, p.125-134, 1999.

HARDY, K. Cell death in the mammalian blastocyst. **Molecular Human Reproduction**, v.3, p.919-925, 1997.

HARRISON, R.A.; MILLER, N.G. cAMP-dependent protein kinase control of plasma membrane lipid architecture in boar sperm. **Molecular Reproduction and Development**, v.55, p.220-228, 2000.

HERBERT, K.E.; BHUSATE, L.L.; SCOTT, D.L.; DIAMANTOPOULOS, C.; PERRETT, D. Effect of laser light at 820 nm on adenosine nucleotide levels in human lymphocytes. **Lasers in the Life Sciences**, v.3, p.37-46, 1989.

HILF, R.; MURANT, R.S.; NARANYANAN, U.; GIBSON, S.L. Relationship of mitochondrial function and cellular adenosine triphosphate levels to hematoporphyrin derivative-induced photosensitization in R3230AC mammary tumors. **Cancer Research**, v.46, p.211-217, 1986.

JANIS, R.A., SILVER, P.J.; TRIGGLE, D.J. Drug action and cellular calcium regulation. **Advances in Drugs Research**, v.16, p.309-591, 1987.

JHA, K.N.; KAMESHWARI, D.B.; SHIVAJI, S. Título. **Cellular and Molecular Biology**, v.49, p.329-340, 2003.

KARU T.I. Molecular mechanism of therapeutic effect of low intensity laser irradiation. **Lasers in the Life Sciences**, v.2, p.53-74, 1988.

KARU, T.I. Depression of the genome after irradiation of human lymphocytes with He-Ne laser. **Laser Therapy**, v.4, p.5-24, 1992.

KARU, T.I.; KUTOMKINA, E.V.; LYAPUNOVA, T.S.; POMOSHNIKOVA, V.A. The activation of yeast metabolism with He-Ne laser radiation. III. Protein synthesis in *Saccharomyces ludwigii* grown in aerobic and anaerobic conditions. **Lasers in the Life Sciences**, v.5, p.259-266, 1993.

KARU, T.I.; PYATIBRAT, L.; KALENDO, G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.27, p.219-223, 1995.

KARU, T.I. **The science of lower-power laser therapy**. Amsterdam: Gordon and Breach, 1998.

KARU, T.I. Primary and secondary mechanisms of action of visible-to-near IR radiation on cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v.49, p.1-17, 1999.

KNIJN, H.M.; GJØRRET, J.O.; VOS, L.A.M.P.; HENDRIKSEN, P.J.M.; VAN DER WEIJDEN, B.C.; MADDOX-HYTTEL, P.; DIELEMAN, S.J. Consequences of *in vivo* development and subsequent culture on apoptosis, cell number, and blastocyst formation in bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v.69, p.1371-1378, 2003.

KURAN, M.; ROBINSON, J.J.; STAINES, M.E.; MCEVOY, T.G. Development and de novo protein synthetic activity of bovine embryos produced *in vitro* in different culture systems. **Theriogenology**, v.55, n.2, p.593-606, 2001.

KURTU, J.M.; AMBROSE, J.D.; RAJAMAHENDRAN, R. Cleavage rate of bovine oocytes *in vitro* is affected by bulls but not sperm concentrations. **Theriogenology**, v.45, p.257, 1996.

LAX, Y.; RUBINSTEIN, S.; BREITBART, H. Epidermal growth factor induces acrosomal exocytosis in bovine sperm. **FEBS Letters**, v.339, p.234–238, 1994.

LECLERC, P.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. **Free Radicals in Biological Medicine**. v.22, p.643–656, 1997.

LEESE, H.J. Metabolic control during preimplantation mammalian development. **Human Reproduction Update**, v.1, p.63–72, 1995.

LUBART R, FRIEDMANN H, LEVINSHAL T, LAVIE R, BREITBART H. Effect of light on calcium transport in bull sperm cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v.15, p.337–341, 1992.

LUBART, R.; FRIEDMANN, H.; SINYKOV, M.; COHEN, N.; BREITBART, H. Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membranes caused by 780 nm irradiation. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.21, p.493–499, 1997.

LUNDIN, K.; BERGHT, C.; HARDARSON, T. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human *in vitro* fertilization. **Human Reproduction**, v.16, n.12, p.2652-2657, 2001.

MAHONY, M.C.; GWATHMEY, T.Y. Protein tyrosine phosphorylation during hyperactivated motility of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.60, p.1239–1243, 1999.

MILLER, G.F.; GLIEDT, D.W.; RAKES, J.M.; ROVI, R.W. Addition of penicillamine, hypotaurine and epinephrine (PHE) or Bovine oviductal epithelial cells (BOEC) alone or combination to bovine *in vitro* fertilization medium increases the subsequent embryo cleavage rate. **Theriogenology**, v.41, p.689-696, 1994.

NASR-ESFAHANI, M.M.; JOHNSON, M.H. The origin of reactive oxygen species in mouse embryos cultured *in vitro*. **Development**, v.113, p.551–560, 1991.

NASSAR, A.; MAHONY, M.; MORSHEDI, M.; LIN, M.H.; SRISOMBUT, C.; OEHNINGER, S. Modulation of sperm tail protein tyrosine phosphorylation by pentoxifylline and its correlation with hyperactivated motility. **Fertility and Sterility**, v.71, p.919–923, 1999.

NAZ, R.K.; AHMAD, K.; KUMAR, R. Role of membrane phosphotyrosine proteins in human spermatozoa function. **Journal of Cell Science**, v.99, p.157-165, 1991.

NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequent development, **Theriogenology**, v.53, p.21-74, 1999.

OCAÑA-QUERO, J.M.; GOMEZ-VILLAMANDOS, R.; MORENO-MILLAN, M.; SANTISTEBAN-VALENZUELA, J.M. Biological effects of helium-neon (He-Ne) laser irradiation on acrosome reaction in bull sperm cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.40, p.294-298, 1997.

O'TOOLE, C.M.B.; ARNOULT, C.; DARZSON, A.; STEINHARDT, R.A.; FLORMAN, H.A. Ca^{2+} entry through storeoperated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. **Molecular Biology of the Cell**, v.11, p.1571-1584, 2000.

PASSARELLA, S.; PERLINO, E.; QUAGLIARIELLO, E.; BALDASSARRE, L.; CATALANO, I.M.; CINGOLANI, A. Evidence of changes induced by He-Ne laser irradiation in the biochemical properties of rat liver mitochondria. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v.10, p.185-198, 1983.

PASSARELLA, S.; OSTUNI, A.; ATLANTE, A.; QUAGLIARIELLO, E. Increase in the ADP/ATP exchange in rate liver mitochondria irradiated *in vitro* by He-Ne laser. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.156, p.978-986, 1988.

PASSARELLA, S.; CASAMASSIMA, F.; MOLINARI, S.; PASTORE, D.; QUAGLIARIELLO, E.; CATALANO, I.M.; CINGOLANI, A. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated *in vitro* by He-Ne laser. **FEBS Letters**, v.175, p.95-99, 1994.

PLANTE, L.; KING, W.A. Effect of time to first cleavage on hatching rate of bovine embryos *in vitro*. **Theriogenology**, v.37, p.247, 1992.

PRATHER, R.S.; FIRST, N.L. A review of early mouse embryogenesis and its application to domestic species. **Journal of Animal Science**, v.66, p.2626-2635, 1988.

ROGERS, B.J.; YANAGIMACHI, R. Retardation of guinea pig sperm acrosome reaction by glucose: the possible importance of pyruvate and lactate metabolism in capacitation and the acrosome reaction. **Biology of Reproduction**, v.13, p.568-575, 1975.

ROLDAN, E.R. Role of phospholipases during sperm acrosomal exocytosis. **Frontiers in Bioscience**, v.3, p.D.1109-19, 1998.

SAS. **USER'S GUIDE: basic and statistic**. Cary, NC: SAS, p.1.686, 1995.

SI, Y.; OKUNO, M. Role of tyrosine phosphorylation of flagellar proteins in hamster sperm hyperactivation. **Biology of Reproduction**, v.61, p.240–246, 1999.

THOMPSON, J.G. Comparison between *in vivo*-derived and *in vitro*-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v.9, p.341–354, 1997.

TRAVIS, A.J.; JORGEZ, C.J.; MERDIUSHEV, T.; JONES, B.H.; DESS, D.M.; DIAZ-CUETO, L.; STOREY, B.T.; KOPF, G.S.; MOSS, S.B. Functional relationships between capacitation-dependent cell signaling and compartmentalized metabolic pathways in murine spermatozoa. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.7630–7636, 2001.

TRIGGLE, D.J. Calcium antagonists: basic chemical and pharmacological aspects. In: WEISS, G.B. **New perspectives on calcium antagonists**, Maryland: American Physiological Society, p. 1-18, 1981.

URNER, F.; LEPPENS-LUISIER, G.; SAKKAS, D. Protein tyrosine phosphorylation in sperm during gamete interaction in the mouse: the influence of glucose. **Biology of Reproduction**, v.64, p.1350–1357, 2001.

URNER, F.; SAKKAS, D. Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. **Reproduction**, v.125, p.17–26, 2003.

VAN SOON, A.; VAN VLAENDEREN, I.; MAHMOUDZADEH, A.R.; DELUYBER, H.; DEKRUIF, A. Compaction rate of *in vitro* fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. **Theriogenology**, v.38, p.905-920, 1992.

VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M.T.; DE KRUIF, A. Relationship between timing of development, morula morphology and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in *in vitro* produced bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.47, p.47-56, 1997.

VEKSHIN, NL. Light-dependent ATP synthesis in mitochondria. **Molekuliarnaia Biologiia (Moskva)**, v.25, p.54-59, 1991.

VISCONTI, P.E.; GALANTINO-HOMER, H.; MOORE, G.D.; BAILEY, J.L.; NING, X.; FORNES, M.; KOPF, G.S. The molecular basis of sperm capacitation. **Journal of Andrology**, v.19, p.242-248, 1998.

VISCONTI, P.E.; WESTBROOK, V.A.; CHERTIHIN, O.; DEMARCO, I.; SLEIGHT, S.; DIEKMAN, A.B. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. **Journal of Reproductive Immunology**, v.53, p.133–150, 2002.

VIUFF, D.; HENDRIKSEN, P.J.M.; VOS, P.; DIELEMAN, S.J.; BIBBY, B.M.; GREVE, T.; HYTTEL, P.; THOMSEN, P.D. Chromosomal abnormalities and developmental kinetics in *in vivo*-developed cattle embryos at days 2 to 5 after ovulation. **Biology of Reproduction**, v.65, p.204–208, 2001.

XU, K.P.; GREVE, T.; CALLESEN, H.; HYTTEL, P. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.81, p. 501-504, 1987.

WALENSKY, L.D.; SNYDER, S.H. Inositol 1,4,5- trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. **Journal of Cell Biology**, v.130, p.857-869, 1995.

WASSARMAN, P.M. Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. **Cell**, v.96, p.175-183, 1999.

WATSON, P.F.; PLUMMER, J.M.; JONES, P.S.; BREDL, P.S. Localization of intracellular calcium during the acrosome reaction in ram spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v.41, p.513-520, 1995.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; CARNWATH, J.W.; NIEMANN, H. Expression of the gap junction gene connexin43 (Cx43) in preimplantation bovine embryos derived *in vitro* or *in vivo*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.108, p.17-24, 1996.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: **Physiology of Reproduction**. New York: Raven, p.189-317, 1994.

YOUNG, S.R.; DYSON, M.; BOLTON, P. Effect of light on calcium uptake by macrophages. **Laser Therapy**, v.2, p.53-7, 1990.

CAPÍTULO 4 – EFEITOS DA IRRADIAÇÃO COM LASERS DE BAIXA POTÊNCIA NO CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

Título

Efeitos da Irradiação com Lasers de Baixa Potência no Cultivo *In vitro* de Embriões Bovinos

Resumo

RESUMO – O sistema de cultivo *in vitro* de embriões apresenta menor eficiência em relação ao *in vivo*, sendo caracterizado por menores taxas de desenvolvimento e de implantação dos embriões, além de uma menor tolerância à criopreservação. Alterações no meio de cultivo embrionário podem afetar profundamente o desenvolvimento pré-implantacional. A bioestimulação promovida pela irradiação com lasers de baixa potência pode aumentar os níveis energéticos celulares, elevando a disponibilidade de nucleotídeos cíclicos moduladores da síntese de DNA e RNA. O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos da irradiação com lasers infravermelho e visível-vermelho no cultivo *in vitro* (CIV) de embriões bovinos. Oócitos foram coletados a partir de ovários de abatedouro, maturados e fertilizados *in vitro*, sendo destinados ao CIV por sete dias. No terceiro dia de CIV os embriões foram tratados com quatro tempos de irradiação (30 segundos – L30; 60 segundos – L60; 120 segundos – L120; 180 segundos – L180) para cada tipo de laser, separadamente. A produção embrionária foi avaliada ao sétimo dia de CIV. No tratamento com laser visível foi observada menor taxa de embriões no grupo L30 (36,86%) em relação ao grupo C30 (52,29%). No tratamento com laser infravermelho não foram constatadas diferenças nas taxas de produção embrionária entre os grupos tratados e seus respectivos controles. A cinética no desenvolvimento embrionário ao sétimo dia de CIV foi acompanhada, não sendo notadas diferenças estatísticas entre os grupos

controle e tratados com o laser infravermelho. No tratamento com laser visível foi constatada menor taxa de produção de blastocistos iniciais no grupo L60 (19,42%) em relação ao C60 (39,79%). A qualidade embrionária ao sétimo dia de CIV foi avaliada por meio da contagem do número total de células, não sendo observadas diferenças entre os grupos tratados e os grupos controle, tanto para as irradiações com laser infravermelho quanto para com laser visível. Assim, a irradiação com o laser infravermelho em embriões bovinos durante 30, 60, 120 e 180 segundos, aplicada ao terceiro dia de cultivo *in vitro*, não afetou as taxas de produção embrionária e a cinética de desenvolvimento, bem como o número total de células embrionárias ao sétimo dia de cultivo *in vitro*. O tratamento de embriões com laser visível, reduziu o índice de produção embrionária quando aplicado durante 30 segundos ao terceiro dia de CIV, e acelerou a cinética de desenvolvimento embrionário quando irradiado durante 60 segundos ao terceiro dia de CIV, mas não afetou o número de células embrionárias ao sétimo dia de cultivo *in vitro*.

Palavras-Chave: Embrião bovino, Cultivo *in vitro*, Laser de baixa potência

1. Introdução

Apesar das altas taxas de sucesso na maturação e fertilização *in vitro* em bovinos, aproximadamente 80% dos oócitos clivados não alcança o estágio de blastocisto (RIZOS et al. 2002a). O sistema de cultivo *in vitro* de embriões apresenta menor eficiência em relação ao *in vivo* (VAN SOOM et al., 1997), sendo reflexo de embriões com citoplasmas mais escurecidos e com menor densidade (conseqüência de sua alta concentração lipídica), zona pelúcida mais frágil, reduzidos mecanismos de comunicação intercelular, alta incidência de anormalidades cromossômicas, menores taxas de clivagem, assincronia na formação dos pró-núcleos e maiores taxas de apoptose. Essas diferenças levam a menores taxas de desenvolvimento e de implantação dos embriões PIV (VAN WAGTENDONK et al., 2000), além de uma menor tolerância à criopreservação, ou

ainda, à ocorrência da síndrome do bezerro gigante (KHURANA & NIEMANN, 2000).

A produção de embriões bovinos é determinada não somente pela qualidade do oócito, mas também pelo sistema de cultivo. Em sistemas desenvolvidos *in vitro*, alterações no meio de cultivo embrionário após a fertilização podem afetar profundamente a expressão gênica de RNAs mensageiros correspondentes a genes importantes no desenvolvimento do embrião (WRENZYCKI et al., 1999, 2001; RIEF et al., 2002; RIZOS et al., 2002b, 2003). Conseqüentemente, processos fundamentais que ocorrem durante o desenvolvimento pré-implantacional podem ser afetados, tais como: primeira clivagem, ativação do genoma embrionário, compactação da mórula (estabelecimento do primeiro contato célula-célula no embrião) e formação do blastocisto, (desenvolvimento do trofoblasto e a massa celular interna) (RIZOS et al., 2002a).

A bioestimulação promovida pela irradiação dos lasers de baixa potência aumenta os níveis energéticos celulares e pode suprir o déficit energético na CIV de embriões, pois aumenta a disponibilidade de nucleotídeos cíclicos moduladores da síntese de DNA e RNA (KARU et al., 1988), contribuindo para o desenvolvimento embrionário.

Atualmente, as reações bioquímicas induzidas pela irradiação a laser de baixa potência ainda não estão totalmente esclarecidas e enfatizam, pois, a necessidade de maiores estudos sobre a sua ação na biologia celular (KREISLER et al., 2002), principalmente no que se refere à sua utilização no cultivo embrionário *in vitro*.

2. Revisão de literatura

2.1 Necessidades metabólicas

Além das diferenças morfológicas, ultra-estruturais, fisiológicas e genômicas (HOLM & CALLESEN, 1998; KRUIP & DENDAAS, 1997), os embriões produzidos *in vivo* diferem dos embriões PIV no que se refere ao seu metabolismo (RIEGER, 1992; GARDNER, 1998), pois se observa que as condições insuficientes de substratos energéticos oferecidos *in vitro* determinam um processo de estresse, limitando o desenvolvimento (KHURANA & NIEMANN, 2000). Tal estresse é comprovado pelas altas taxas de lactato produzidas pelo blastocisto, uma vez que os blastocistos PIV apresentam uma alta necessidade energética, utilizada nos processos de compactação, expansão e formação da blastocele (BENOS & BALABAN, 1980).

Estudos em diversas espécies vêm mostrando que o metabolismo embrionário mamífero em estágios pós-compactacionais podem ser manipulados de forma a melhorar o desenvolvimento (LEESE et al., 1998; BAVISTER, 1995; GARDNER & LANE, 1993).

2.3 Fosforilação oxidativa e glicólise

O processo de fosforilação oxidativa é o maior responsável pela produção de energia do organismo, na forma de adenosina tri-fosfato (ATP) (LEHNINGER, 1993). Assim como na maioria das células, embriões na fase pré-implantacional são altamente dependentes da fosforilação oxidativa como mecanismo primário na produção de energia, particularmente durante o período pré-compactacional, quando 90% de todo ATP é derivado da oxidação (THOMPSON et al., 1996). Durante a compactação e blastulação, a demanda por ATP aumenta, o que acarreta em elevação na síntese protéica (THOMPSON et al., 1998) e na atividade da Na^+-K^+ ATPase (LEESE et al., 1991), os quais formam um potencial osmótico através do trofocotoderma, produzindo a blastocele. O aumento na demanda por ATP causa elevação no consumo da maioria dos substratos, incluindo oxigênio e

piruvato (THOMPSON et al., 1996), aminoácidos (PARTRIDGE & LEESE, 1996) e glicose (THOMPSON et al., 1996). Em bovinos, estudos sobre fosforilação oxidativa no cultivo *in vitro* de embriões reforçaram a evidência de que a geração de ATP mitocondrial é necessária para o desenvolvimento ocorrer. A adição de inibidores da OXPHOS foi suficiente para suprimir o transporte elétrico e o consumo de oxigênio de forma a inibir o desenvolvimento posterior dos blastocistos (THOMPSON et al., 2000).

Além da fosforilação oxidativa, a glicólise também funciona como fonte de produção de ATP, podendo seu consumo aumentar de taxas de 4-8%, durante os estágios de pré-compactação, para 15-18%, durante a pós-compactação, desde que num ambiente rico em O₂. A habilidade em produzir ATP independente da fosforilação oxidativa varia entre as espécies. Em embriões de ratos, experimentos envolvendo a adição de inibidores da fosforilação oxidativa mostraram que o processo de glicólise foi capaz de suprir a demanda de ATP necessária para os processos de compactação e blastulação (BRISON & LEESE, 1994). Já em camundongos, o desenvolvimento peri-compactacional não ocorreu sem o auxílio da fosforilação oxidativa (THOMSON, 1967).

Estudos prévios têm sugerido que a fotobioestimulação ocorre por meio de enzimas envolvidas no transporte elétrico da cadeia respiratória, localizadas nas mitocôndrias (KARU, 1989; YU et al., 1997). A irradiação com laser de baixa potência em mitocôndrias isoladas resultou na elevação de fatores que determinam o estado energético mitocondrial, tais como: o potencial de membrana mitocondrial (PASSARELLA et al., 1984; PASTORE et al., 1996), o gradiente de prótons (PASTORE et al., 1994) e a taxa de troca de ADP/ATP (PASSARELLA et al., 1988). Do mesmo modo, a ação do laser de baixa potência na elevação da síntese de ATP foi verificada em diversos modelos celulares como células de adenocarcinoma mamário (HILF et al., 1986) células HeLa (KARU et al., 1995), linfócitos humanos (MANTEIFEL & KARU, 1992; BAKEEVA et al., 1993), células neurais (RUSAKOV, 1990), células miocárdicas enfartadas (ORON et al., 2001), e células hepáticas (PASSARELLA et al., 1994; YU et al., 1997).

2.4 Espécies Reativas do Oxigênio (EROs)

Apesar de a fosforilação oxidativa ser o mecanismo mais efetivo na produção de energia, a grande variedade de reações de oxidação, incluindo as reações da cadeia de transporte elétrico, libera constantemente pequenas quantidades de intermediários reduzidos do oxigênio, tais como o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^\cdot). Estas três EROs estão entre as mais geradas pelo metabolismo embrionário, sendo este e o ambiente onde o embrião está inserido, as fontes de sua produção (MANES AND LAI, 1995). Elas são capazes atravessar as membranas celulares, e quando em excesso, podem alterar diversas moléculas celulares, tais como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. As conseqüências são múltiplas, incluindo alterações mitocondriais, bloqueio celular embrionário, depleção de ATP e apoptose (GUÉRIN et al., 2001).

Em embriões produzidos in vitro, sabe-se que a geração de EROs é maior em relação aos embriões produzidos in vivo, provavelmente pela presença de altas concentrações de oxigênio, distúrbios nos níveis de substratos metabólicos (GUÉRIN et al., 2001), ou ainda por efeito da luz (NAKAYAMA et al., 1994). Esta pode causar prejuízos celulares tais como a oxidação de bases e a quebra da fita de DNA (BEEHLER et al., 1992) sendo que a exposição transitória de embriões de camundongos à luz visível foi suficiente para provocar uma elevação nos níveis de H_2O_2 (GOTO et al., 1993).

Estudos têm evidenciado que a luz laser altera o estado funcional das células (KUJAWA et al., 2004), parcialmente por influenciar nas reações de oxido-redução, as quais ocorrem durante o transporte elétrico na mitocôndria, bem como na geração de EROs a partir delas (JOU et al., 2004). Os radicais livres derivados do oxigênio têm sido propostos como possíveis mediadores na ativação de sistemas biológicos pela luz (FRIEDMAN et al., 1991; STLADER et al., 2000). Callaghan et al (1996) trataram culturas de células hematopoiéticas com laser operando com 660 nm e constataram a indução na produção de EROs e Grossman et al. (1998) irradiaram culturas de queratinócitos com diodo laser

operando em 780 nm e notaram o envolvimento de EROs no efeito proliferativo das células.

2.5 Transcrição

As alterações ocorridas na composição e nas condições dos sistemas de cultivo *in vitro*, comparadas ao sistema *in vivo*, determinam uma alteração no padrão de expressão gênica do embrião (OLIVEIRA et al., 2005; NIEMANN & WRENZYCKI, 2000; NIEMANN & WRENZYCKI, 2002, WRENZYCKI et al., 2005). Durante o período de pré-implantação embrionária, inicia-se a expressão de genes responsáveis pela cinética do desenvolvimento inicial e coordenam os mecanismos homeostáticos e metabólicos, dentre eles, o responsável pela replicação do DNA NAP1L1 (Conjunto de Proteínas-1 semelhante ao Nucleossomo-1), regulação na transcrição (NFLC - Fator Nuclear Semelhante a Citocina), regulação na seleção de proteínas e no transporte de membranas (PSCD2), controle do ciclo celular e transmissão de sinais (TESFAYE et al., 2004), apoptose (Bax) (LONERGAN et al., 2006) ou sua inibição (alivina 1) (TESFAYE et al., 2004), formação de junções gap (Cx43) e interação com receptores (LONERGAN et al., 2006).

Um trabalho desenvolvido por Corcoran et al. (2006) constatou que dentre 384 genes ou ESTs (expressed sequence tags) identificados em blastocistos bovinos, aproximadamente 85% deles apresentaram uma expressão reduzida em embriões cultivados *in vitro* quando comparados *in vivo*, o que pode afetar o desenvolvimento embrionário e fetal posterior (LAZZARI et al., 2002). Em embriões de camundongo, por exemplo, Ecker et al. (2004) e Fernández-Gonzalez et al. (2004) indicaram que o sistema de cultivo *in vitro* pode gerar conseqüências em longo prazo irreversíveis, podendo afetar o desenvolvimento, crescimento, fisiologia e comportamento pós-natais. Portanto, as condições de cultivo no período após a fertilização podem ter efeitos drásticos no padrão de abundância de RNAm de muitos genes importantes no desenvolvimento embrionário.

Com a bioestimulação, portanto, pode-se tentar mimetizar os padrões na expressão de RNAm que ocorrem *in vivo*, pois sabe-se que a irradiação com laser afeta os níveis dos nucleotídeos cíclicos, os quais modulam a síntese de DNA e RNA (KARU et al., 1998). Em um estudo desenvolvido por Zhang et al. (2003), fibroblastos humanos irradiados com comprimento de onda de 628 nm, apresentaram regulação na expressão de 111 genes dos quais 7 deles influenciavam direta ou indiretamente a supressão da apoptose. Diversos estudos envolvendo osteoblastos mostraram que a irradiação com laser de baixa potência estimulou a síntese de DNA (YAMADA, 1991; ORIKASA et al., 1991). Yamamoto et al. (2001) irradiaram culturas de osteoblastos de camundongos com laser de Ga-Al-As e observaram o aumento na expressão do gene MCM3, envolvido na replicação do DNA.

No entanto, raros são os esforços no intuito de averiguar uma possível ação benéfica da bioestimulação com laser sobre o período de cultivo *in vitro* de embriões.

Portanto, com base nas informações anteriores acerca da bioestimulação pelo laser, efeitos benéficos podem ser oferecidos não somente nos eventos de maturação e fecundação, mas também durante o desenvolvimento embrionário, uma vez que o laser pode oferecer maior energia para a célula irradiada.

3. Material e métodos

3.1 Obtenção e maturação *in vitro* de oócitos bovinos

Os oócitos foram obtidos por aspiração folicular de ovários bovinos coletados em matadouro e em seguida, foram selecionados e maturados *in vitro* em meios apropriados durante 24 horas em estufa com atmosfera úmida a 38,5°C e 5% de CO₂, de acordo com metodologia descrita no apêndice A.

3.2 Fertilização *in vitro* de oócitos bovinos

Os oócitos maturados *in vitro* foram fertilizados de acordo com protocolo descrito no apêndice C utilizando-se sêmen irradiado isoladamente com laser. As placas de cultivo contendo oócitos e espermatozóides foram retornados para incubadora, permanecendo por mais 18-22 horas, em atmosfera úmida a 38,5°C e 5% de CO₂.

3.3 Cultivo *in vitro* de oócitos bovinos

Após 18 a 22 horas de co-incubação de oócitos e espermatozóides em incubadora, os supostos zigotos tiveram suas células do *cumulus* removidas por sucessivas pipetagens e foram transferidos para gotas contendo meio de cultivo *in vitro* (CIV), sendo devolvidos para a incubadora. Após 72 horas de cultivo (D3), foi realizado o primeiro “feeding”, com a remoção de 50 µL de meio das gotas de cultivo e acréscimo de 50 µL de meio CIV novo. Posteriormente, realizou-se o 2º feeding no D5 (120 hpf) substituindo 50 µL de meio antigo com 50 µL de meio novo, suplementado com 0,5 mM de glicose. Deu-se continuidade ao cultivo até o D7 (168 hpf).

3.4 Equipamento de Laser

Durante o cultivo *in vitro*, os embriões foram submetidos à irradiação com laser. A descrição do equipamento de laser bem como dos padrões de irradiação utilizados neste e nos demais capítulos encontram-se detalhados no apêndice B.

3.5 Experimento IV - Efeitos da irradiação de embriões com laser infravermelho (780 nm) e visível (660 nm) na produção e cinética do desenvolvimento de blastocistos

O experimento avaliou os efeitos do laser infravermelho (780 nm) e do laser vermelho (660 nm) com diferentes tempos de irradiação sobre o cultivo de embriões. Foram utilizados 2496 oócitos, sendo 1336 destinados ao tratamento

com laser infravermelho e 1160 ao laser visível. Ao 3^o dia de cultivo (72 hpf), os embriões foram distribuídos em quatro grupos de tratamento: 30 segundos (**L30**), 60 segundos (**L60**), 120 segundos (**L120**) e 180 segundos (**L180**) de irradiação e 4 respectivos grupos controle, (**C30, C60, C120, C180**). Procedeu-se a irradiação com laser individualmente sobre cada grupo a ser tratado. Grupos controles, respectivos aos tratados (**C30, C60, C120, C180**), foram submetidos à mesma manipulação, exceto pela irradiação. Deu-se continuidade ao cultivo *in vitro*, até 7^o dia de desenvolvimento (168 hpf), quando foi quantificado o número de embriões produzidos em cada grupo em relação ao total de estruturas presentes nele.

Ao ser feita a verificação da taxa de embriões, foi realizada também a classificação dos embriões de acordo com seus estágios de desenvolvimento, tendo como objetivo verificar se a irradiação com laser sobre os embriões ao 3^o dia de cultivo interferia na velocidade de desenvolvimento embrionário posterior. As estruturas foram classificadas em quatro estágios diferentes: blastocisto inicial (Bi); blastocisto (Bl); blastocisto eclodido (Becl) e blastocisto expandido (Bx).

3.6 Experimento V - Efeitos da irradiação de embriões com laser infravermelho (780 nm) e visível (660 nm) na qualidade dos blastocistos

O experimento avaliou os efeitos dose-resposta do laser infravermelho (780 nm) e do laser vermelho (660 nm) com diferentes tempos de irradiação no cultivo *in vitro* de embriões. Foram utilizados 843 embriões, sendo 382 destinados ao tratamento com laser infravermelho e 461 ao laser visível. O delineamento aqui utilizado foi realizado de maneira idêntica ao experimento anterior, no entanto, sem avaliação das estruturas.

No sétimo dia de cultivo *in vitro*, iniciou-se o processo de coloração nuclear dos embriões, para a contagem total de células presentes. Os embriões foram retirados de suas gotas CIV, lavados em meio T₀ (TCM199 suplementado com HEPES). Em seguida, foram transferidos para solução de pronase, permanecendo nela durante 5 minutos para a dissolução de sua zona pelúcida e depois lavados

três vezes em meio T₁₀ (TCM199 suplementado com HEPES e 10% SFB) para a inativação da enzima. Foram fixados em solução de ácido pícrico, em gelo, durante 10 minutos, seguidos de uma lavagem em meio T₀ e outra em meio PBS acrescido de 0,3% de BSA. Finalmente foram corados com solução de Hoechst 33342 (10 µg/mL de SB) e visualizados em microscópio de epifluorescência (Figura 13). O número de blastômeros presentes em cada embrião foi computado.

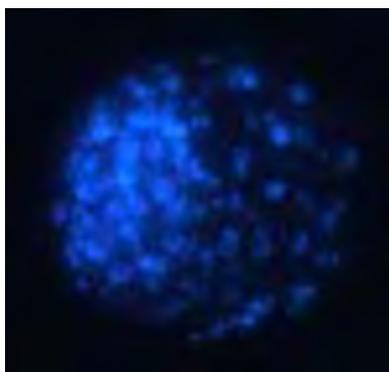


Figura 13. Blastocisto bovino ao 7^o dia de cultivo *in vitro* corado com 10g/mL de Hoechst 33342 durante 10 minutos, observado sob microscopia óptica epifluorescente.

3.7 Análise Estatística

Os dados foram avaliados utilizando metodologia de quadrados mínimos, por meio do procedimento PROC GLM com o programa *Statistical Analysis System*, versão 9.1.3 (SAS, 1995). As variáveis foram transformadas de acordo a função raiz arco-seno das percentagens de embriões produzidos em relação ao total de oócitos destinados à maturação, do número total de células embrionárias, e das proporções de blastocistos em suas diferentes categorias (Bi, BI, Bx e Becl) em relação ao total de embriões produzidos conforme as recomendações de BANZATTO & KRONCA (2006). Posteriormente, as variáveis transformadas foram submetidas às análises de variância, e havendo significância nos resultados, os dados foram analisados com procedimento de comparações múltiplas, o Teste *t* de Student, sendo, posteriormente, as médias retornadas à escala original para apresentação dos resultados.

4. Resultados

4.1 Experimento IV - Efeitos da irradiação de embriões com laser infravermelho (780 nm) e visível (660 nm) na produção e cinética do desenvolvimento de blastocistos

Os resultados obtidos em relação à produção de embriões nos grupos controle (C30, C60, C120, C180) e tratados (L30, L60, L120, L180) com os lasers infravermelho e visível estão descritos na Tabela 10 e Figura 14.

Tabela 10. Porcentagem de embriões produzidos *in vitro* ao sétimo dia de cultivo, em relação ao total de oócitos maturados.

Tempos de Irradiação	Produção de embriões ao D7 ¹ (%* ± Erro Padrão)			
	Laser Infravermelho		Laser Visível	
	C	L	C	L
30 seg.	32,84 ± 4,24 ^b	37,33 ± 4,24 ^b	52,29 ± 4,53 ^a	36,86 ± 4,53 ^b
60 seg.	29,55 ± 4,24 ^a	28,35 ± 4,24 ^a	42,71 ± 4,53 ^a	33,67 ± 4,89 ^a
120 seg.	34,26 ± 4,24 ^a	31,36 ± 4,24 ^a	39,00 ± 4,53 ^a	41,29 ± 4,53 ^a
180 seg.	33,24 ± 4,24 ^{a,b}	24,21 ± 4,24 ^b	41,29 ± 4,53 ^a	37,57 ± 4,53 ^a

¹D7 = sétimo dia de cultivo *in vitro*.

*Valor calculado em função do número total de oócitos maturados *in vitro*.

^{a,b}Letras iguais entre colunas na mesma linha não diferem entre si.

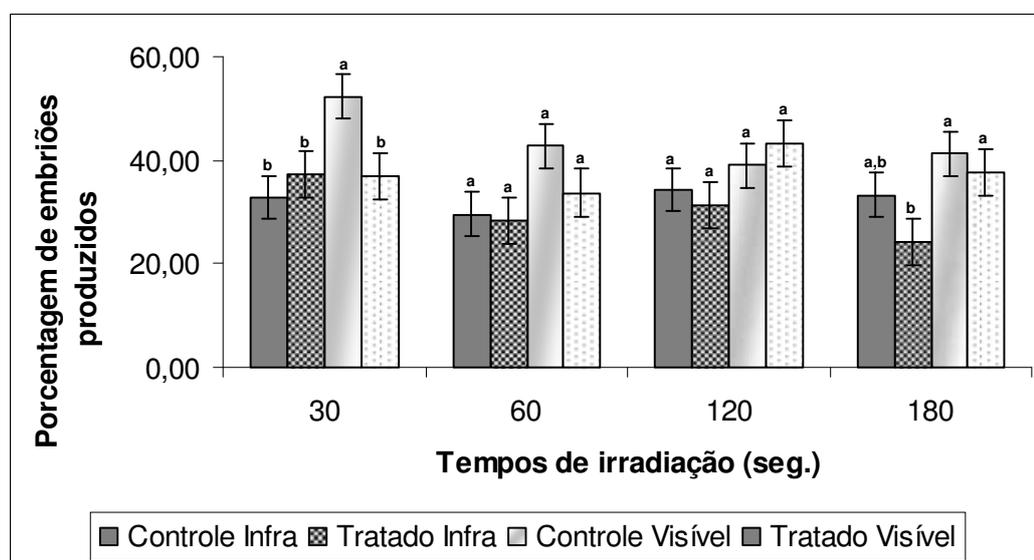


Figura 14. Porcentagem de embriões produzidos *in vitro* ao sétimo dia de cultivo, em relação ao total de oócitos destinados à maturação.

Dentre os resultados obtidos após a irradiação com laser visível, pode-se comprovar uma menor produção embrionária no grupo irradiado durante 30 seg. (L30 – 36,86%), quando comparado ao seu respectivo grupo controle (C30 – 52,29%) ($p < 0,05$). Os grupos tratados com maiores tempos de irradiação não apresentaram diferenças estatísticas significativas na produção embrionária em relação aos seus respectivos controles, apesar dos grupos L60 (33,67%) e L180 (37,57%) mostrarem produções numericamente menores em relação aos grupos C60 (42,71%) e C180 (41,29%) e do grupo L120 (41,29%) mostrar produção numericamente maior em relação ao C120 (39,0%). Os embriões irradiados com laser infravermelho não apresentaram diferenças estatísticas significativas na produção embrionária ($p > 0,05$), apesar de ter havido maior produção numérica no grupo irradiado com laser visível durante 30 seg. (L30 – 37,33%), quando comparado ao seu respectivo grupo controle (C30 – 32,84%) ($p < 0,05$). Nos grupos mantidos por maiores tempos sob irradiação, as taxas de produção foram numericamente menores (L60 – 28,35; L120 – 31,36 e L180 – 24,21%) em relação aos respectivos grupos controle (C60 – 29,55; C120 – 34,26 e C180 – 33,24%).

Com relação à cinética de desenvolvimento embrionário, os resultados obtidos com os lasers infravermelho e visível estão descritos nas Tabelas 11 a 14 e Figura 15.

Tabela 11. Porcentagem de blastocistos iniciais produzidos *in vitro* ao D7, em relação ao total de embriões produzidos.

Tempos de Irradiação	Produção de Blastocistos Iniciais ao D7 ¹ (%* ± Erro Padrão)			
	Laser Infravermelho		Laser Visível	
	C	L	C	L
30 seg.	65,74 ± 7,48 ^a	45,00 ± 7,48 ^{a,b}	29,27 ± 8,00 ^b	31,55 ± 8,00 ^b
60 seg.	47,81 ± 7,48 ^a	50,08 ± 7,48 ^a	39,79 ± 8,00 ^a	19,42 ± 8,00 ^b
120 seg.	47,81 ± 7,48 ^a	39,61 ± 7,48 ^a	24,41 ± 8,00 ^a	32,38 ± 8,00 ^a
180 seg.	45,88 ± 7,48 ^a	34,70 ± 7,48 ^a	41,62 ± 8,00 ^a	32,56 ± 8,00 ^a

¹D7 = sétimo dia de cultivo *in vitro*.

*Valor calculado em função do número total de oócitos maturados *in vitro*.

^{a,b}Letras iguais entre colunas na mesma linha não diferem entre si.

Tabela 12. Porcentagem de blastocistos produzidos *in vitro* ao D7, em relação ao total de embriões produzidos.

Tempos de Irradiação	Produção de Blastocistos ao D7 ¹ (%* ± Erro Padrão)			
	Laser Infravermelho		Laser Visível	
	C	L	C	L
30 seg.	26,22 ± 6,94 ^a	37,02 ± 6,94 ^a	31,86 ± 7,42 ^a	43,59 ± 7,42 ^a
60 seg.	32,06 ± 6,94 ^a	39,64 ± 6,94 ^a	35,57 ± 7,42 ^a	32,00 ± 7,42 ^a
120 seg.	28,29 ± 6,94 ^a	36,49 ± 6,94 ^a	36,47 ± 7,42 ^a	36,75 ± 7,42 ^a
180 seg.	30,46 ± 6,94 ^a	48,04 ± 6,94 ^a	23,71 ± 7,42 ^a	45,39 ± 7,42 ^a

¹D7 = sétimo dia de cultivo *in vitro*.

*Valor calculado em função do número total de oócitos maturados *in vitro*.

^{a,b}Letras iguais entre colunas na mesma linha não diferem entre si.

Tabela 13. Porcentagem de blastocistos expandidos produzidos *in vitro* ao D7, em relação ao total de embriões produzidos.

Tempos de Irradiação	Produção de Blast. Expandidos ao D7 ¹ (%* ± Erro Padrão)			
	Laser Infravermelho		Laser Visível	
	C	L	C	L
30 seg.	8,04 ± 6,20 ^b	10,24 ± 6,20 ^b	30,85 ± 6,63 ^a	17,40 ± 6,63 ^{a,b}
60 seg.	16,79 ± 6,20 ^a	5,00 ± 6,20 ^a	16,29 ± 6,63 ^a	28,94 ± 6,63 ^a
120 seg.	23,89 ± 6,20 ^a	16,97 ± 6,20 ^a	25,35 ± 6,63 ^a	24,84 ± 6,63 ^a
180 seg.	22,62 ± 6,20 ^a	10,12 ± 6,20 ^a	26,91 ± 6,63 ^a	16,02 ± 6,63 ^a

¹D7 = sétimo dia de cultivo *in vitro*.

*Valor calculado em função do número total de oócitos maturados *in vitro*.

^{a,b}Letras iguais entre colunas na mesma linha não diferem entre si.

Tabela 14. Porcentagem de blastocistos eclodidos produzidos *in vitro* ao D7, em relação ao total de embriões produzidos.

Tempos de Irradiação	Produção de Blast. Eclodidos ao D7 ¹ (%* ± Erro Padrão)			
	Laser Infravermelho		Laser Visível	
	C	L	C	L
30 seg.	0,00 ± 3,57 ^a	7,74 ± 3,57 ^a	8,01 ± 3,82 ^a	7,45 ± 3,82 ^a
60 seg.	3,35 ± 3,57 ^a	5,28 ± 3,57 ^a	8,35 ± 3,82 ^a	5,36 ± 3,82 ^a
120 seg.	0,00 ± 3,57 ^b	6,92 ± 3,57 ^{a,b}	13,78 ± 3,82 ^a	6,03 ± 3,82 ^{a,b}
180 seg.	1,04 ± 3,57 ^a	7,14 ± 3,57 ^a	7,76 ± 3,82 ^a	6,02 ± 3,82 ^a

¹D7 = sétimo dia de cultivo *in vitro*.

*Valor calculado em função do número total de oócitos maturados *in vitro*.

^{a,b}Letras iguais entre linhas na mesma coluna não diferem entre si.

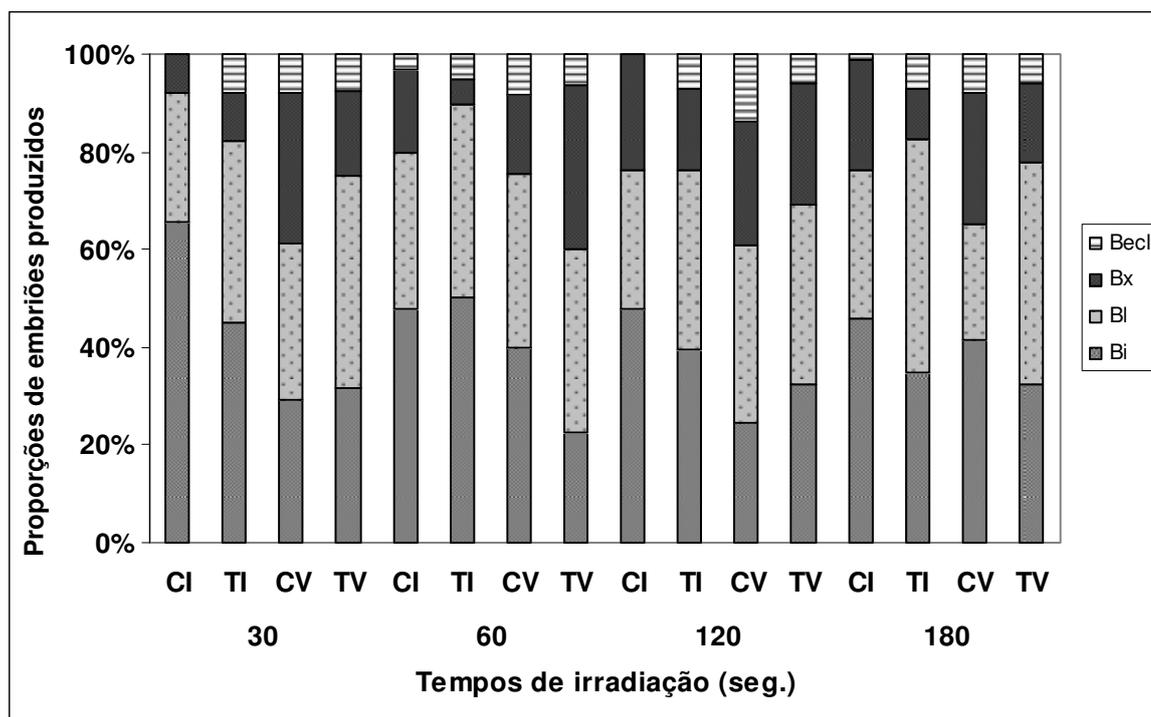


Figura 15. Porcentagem de embriões bovinos produzidos ao sétimo dia de cultivo *in vitro* e avaliados quanto à cinética de desenvolvimento. Becl – blastocisto eclodido; Bx – blastocisto expandido; Bl – blastocisto; Bi – blastocisto inicial.

Dentre os resultados obtidos pode-se comprovar que os grupos tratados com laser infravermelho não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) na proporção de Bi (L30 – 45,0%; L60 – 50,08%; L120 – 39,61%; L180 – 34,70%) em relação aos seus respectivos controles (C30 – 65,74%; C60 – 47,81%; C120 – 47,81%; C180 – 45,88%). Quanto à proporção de blastocistos produzidos, os grupos tratados com laser infravermelho apresentaram médias semelhantes (L30 – 37,02%; L60 – 39,64%; L120 – 36,49%; L180 – 48,04%) ($p > 0,05$) aos respectivos grupos controle (C30 – 26,22%; C60 – 32,06%; C120 – 28,29%; C180 – 30,46%). Com relação à proporção de blastocistos expandidos, não houve diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) entre os grupos tratados (L30 – 10,24%; L60 – 5,0%; L120 – 16,97%; L180 – 10,12%) em relação aos seus respectivos controles (C30 – 8,04%; C60 – 16,79%; C120 – 23,89%; C180 –

22,62%). Da mesma forma, os resultados referentes à proporção de blastocistos eclodidos foram semelhantes ($p>0,05$) entre os grupos tratados (L30 – 7,74%; L60 – 5,28%; L120 – 6,92% e L180 – 7,14%) e seus respectivos grupos controle (C30 – 0%; C60 – 3,35%; C120 – 0% e C180 – 1,04%).

O grupo tratado com laser visível irradiado com 60 segundos apresentou proporção de blastocistos iniciais menor (L60 – 19,42%) em relação ao grupo controle (C60 – 39,79%) ($p<0,05$). Os grupos tratados com laser visível com 30, 120 e 180 segundos de irradiação não apresentaram diferenças estatísticas significativas na proporção de Bi (L30 – 31,55%; L120 – 32,38%; L180 – 32,56%) em relação aos seus respectivos controles (C30 – 29,27%; C120 – 24,41%; C180 – 41,62%). Quanto à proporção de blastocistos produzidos, os grupos tratados com laser visível apresentaram médias semelhantes (L30 – 43,59%; L60 – 32,0%; L120 – 36,75%; L180 – 45,39%) aos respectivos grupos controle (C30 – 31,86%; C60 – 35,57%; C120 – 36,47%; C180 – 23,71%) ($p>0,05$). Com relação à proporção de blastocistos expandidos, os grupos tratados com laser visível também apresentaram médias ($p<0,05$) semelhantes (L30 – 17,40%; L60 – 28,94%; L120 – 24,84%; L180 – 16,02%) aos respectivos grupos controle (C30 – 30,85%; C60 – 16,29%; C120 – 25,35%; C180 – 26,91%). Os resultados referentes à proporção de blastocistos eclodidos no tratamento com laser visível mostraram taxas semelhantes ($p>0,05$) entre os grupos tratados com laser infravermelho (L30 – 7,45%; L60 – 5,36%; L120 – 6,03%; L180 – 6,02%) e os respectivos grupos controle (C30 – 8,01%; C60 – 8,35%; C120 – 13,78%; C180 – 7,76%).

4.2 Experimento V - Efeitos da irradiação de embriões com laser infravermelho (780 nm) e visível (660 nm) na qualidade dos blastocistos

Os resultados obtidos em relação ao número de células embrionárias de blastocistos nos grupos controle (C30, C60, C120, C180) e tratados (L30, L60,

L20, L180) com os lasers infravermelho e visível estão descritos na Tabela 15 e Figura 16.

Tabela 15. Número total de células embrionárias em blastocistos produzidos *in vitro* ao sétimo dia de cultivo.

Tempos de Irradiação	Número total de células embrionárias			
	Laser Infravermelho		Laser Visível	
	C	L	C	L
30 seg.	95,17 ± 8,68 ^a	75,70 ± 4,36 ^a	93,11 ± 4,06 ^a	105,08 ± 9,83 ^a
60 seg.	98,40 ± 9,56 ^a	80,20 ± 9,12 ^a	97,12 ± 7,25 ^a	107,28 ± 7,19 ^a
120 seg.	99,92 ± 6,62 ^a	91,58 ± 6,44 ^a	92,08 ± 6,54 ^a	91,80 ± 6,85 ^a
180 seg.	79,50 ± 7,45 ^b	108,00 ± 6,89 ^{a,b}	100,08 ± 5,93 ^{a,b}	116,82 ± 13,92 ^a

^{a,b}Letras iguais entre colunas na mesma linha não diferem entre si.

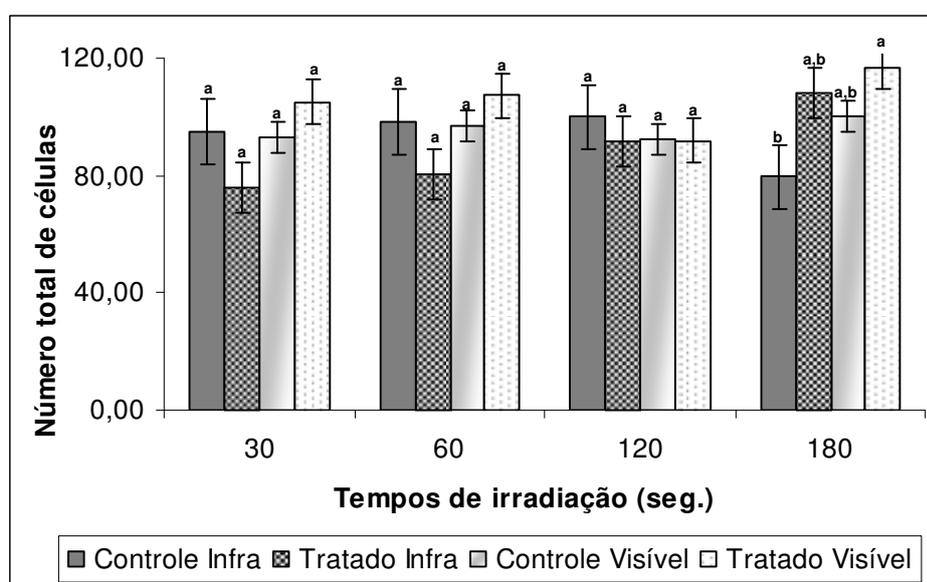


Figura 16. Número de células embrionárias em blastocistos produzidos ao sétimo dia de cultivo *in vitro*.

Os resultados apresentados mostram que o número de células embrionárias em blastocistos foi semelhante entre os grupos tratados com laser infravermelho (L30 – 75,70; L60 – 80,20; L120 – 91,58; L180 – 108,0) e seus grupos controle (C30 – 95,17; C60 – 98,40; C120 – 99,92; C180 – 79,50) ($p > 0,05$). No entanto, houve numericamente menor quantidade de células nos grupos L30 (75,70), L60 (80,20) e L120 (91,58) em relação aos grupos C30 (95,17), C60 (98,40) e C120 (99,92), e maior quantidade numérica de células no grupo L180

(108,0) em relação ao grupo C180 (79,50). Da mesma forma que a irradiação com laser infravermelho, o número total de células embrionárias em blastocistos foram semelhantes ($p>0,05$) entre os grupos tratados com laser visível (L30 – 105,08; L60– 107,28; L120 – 91,80; L180 – 116,82) e seus grupos controle (C30 – 93,11; C60 – 97,12; C120 – 92,08; C180 – 100,08). No entanto, houve numericamente maior quantidade de células nos grupos L30, L60 e L180 em relação aos grupos C30, C60 e C180.

5. Discussão

5.1 Experimento IV - Efeitos da irradiação de embriões com laser infravermelho (780 nm) e visível (660 nm) sobre a produção e cinética no desenvolvimento de blastocistos

Ao avaliarmos as taxas de produção de embriões, notou-se que não houve diferenças estatísticas entre os grupos tratados com os lasers infravermelho e visível, quando comparados aos seus respectivos grupos controle. No entanto, notamos que a taxa de produção embrionária no grupo irradiado durante 30 seg. foi numericamente maior em relação ao seu respectivo grupo controle, ao passo que os números de embriões produzidos nos grupos tratados durante 60, 120 e 180 seg. foram menores em relação aos grupos controle. Baseado nos resultados obtidos pode-se inferir que os efeitos numericamente benéficos da irradiação com o laser infravermelho foram conseguidos com o menor tempo de tratamento, pois a elevação na duração da irradiação levou, proporcionalmente, a uma redução numérica das taxas de embriões produzidos nos grupos tratados em relação aos grupos controle.

Com relação ao tratamento com o laser visível, apesar da ausência de diferenças estatísticas, observamos que houve, numericamente, menores produções de embriões nos grupos irradiados durante 30 e 60 seg. em relação

aos respectivos grupos controle, e maiores nos grupos tratados durante 120 e 180 seg. em relação aos grupos controle. Da mesma maneira que o tratamento com laser infravermelho, pode-se inferir que a irradiação com laser visível proporcionou, numericamente, efeitos benéficos na produção embrionária com os menores tempos de tratamento, pois a elevação na duração da irradiação acarretou em menores taxas de embriões produzidos nos grupos tratados em relação aos grupos controle, mesmo não havendo diferenças estatísticas.

Possivelmente, a irradiação durante 30 seg., apesar da ausência de diferenças estatísticas significativas, tenha sido suficiente para estimular efeitos benéficos do laser no metabolismo embrionário. Os eventos ocorridos durante o período que se estende do terceiro ao sétimo dia de desenvolvimento, como por exemplo, a compactação da mórula e a formação da blastocela dependem do ATP proveniente (THOMPSON et al., 1998; LEESE et al., 1991), em grande parte, da fosforilação oxidativa (THOMPSON et al., 1996) e a ação do laser no aumento na síntese de ATP, já relatado em outras células (HILF et al., 1986; KARU et al., 1995 ; MANTEIFEL & KARU, 1992; BAKEEVA et al., 1993; RUSAKOV, 1990; ORON et al., 2001; PASSARELLA et al., 1994; YU et al., 1997), pode ter ocorrido neste experimento, refletido pela elevação numérica das taxas de produção embrionária nos grupos irradiados. Possíveis efeitos prejudiciais da irradiação com laser de baixa potência podem ter ocorrido e afetado os embriões quando foram submetidos a maiores tempos de irradiação e, conseqüentemente, gerado menores taxas numéricas de embriões. A geração de EROs, já relatada em células somáticas após a irradiação com laser de baixa potência (GROSSMAN et al., 1998), pode também ter acontecido de forma intensa em nosso experimento, quando utilizados tempos de tratamentos mais longos, acarretando posteriormente, em bloqueio celular, depleção de ATP, ou ainda, apoptose nos embriões (GUÉRIN et al., 2001). Desse modo, pode-se sugerir que a irradiação com laser infravermelho em embriões ao terceiro dia de cultivo *in vitro* pode gerar maiores índices de produção embrionária ao sétimo dia de cultivo *in vitro* quando aplicada em tempos de até 30 seg.

A cinética de desenvolvimento embrionário tem sido utilizada em diferentes sistemas de cultivo *in vitro* como critério de seleção de embriões com relação à sua viabilidade (BAVISTER, 1995; VAN SOOM et al., 1997). Este critério envolve aspectos relacionados à velocidade de determinados processos morfológicos, tais como a duração mais curta ou mais longa do processo de compactação de mórulas, a expansão mais lenta ou mais rápida da blastocèle, diferenças no momento da eclosão, dentre outros (GONZALES & BAVISTER, 1997). Neste trabalho, a cinética de desenvolvimento embrionário em cada grupo tratado e controle foi avaliada por meio das proporções de Bi, Bl, Bx e Becl em relação ao total de embriões produzidos no sétimo dia de CIV.

De acordo com as proporções de Bi, Bl, Bx e Becl em relação ao total de embriões produzidos, nota-se que a irradiação com o laser infravermelho não alterou estatisticamente a cinética de desenvolvimento embrionário dos grupos tratados em relação aos grupos controle. No entanto, observamos que o grupo irradiado durante 30 seg. apresentou proporção de Bi numericamente menor em relação ao controle, e proporções numéricas de Bl, Bx e Becl maiores em relação ao controle. Embora se tenha observado uma ação numericamente favorável à velocidade de desenvolvimento dos embriões no grupo tratado durante 30 seg., não se pode afirmar que houve um efeito benéfico dose-dependente da irradiação com laser infravermelho, pois conforme se elevaram os tempos de tratamento, não se tornou evidente o mesmo efeito nas demais categorias devido à ausência de diferenças numéricas consideráveis entre os grupos tratados com maior tempo de irradiação e seus respectivos grupos controle.

Com relação ao tratamento com laser visível, os resultados mostram que o grupo irradiado durante 60 seg. apresentou uma proporção de Bi estatisticamente menor em relação ao controle. Apesar da ausência de diferenças estatísticas nas proporções de Bl, Bx e Becl, os resultados nos permitem inferir que houve um efeito favorável à cinética de desenvolvimento embrionário no grupo tratado durante 60 seg. com laser visível. No entanto, não se pode afirmar que houve um efeito benéfico dose-dependente desta irradiação, pois nos tempos de maior

duração, a elevação na velocidade de desenvolvimento dos embriões não foi estatisticamente observada. Ao estimular a síntese de DNA e RNA celular (KARU et al., 1996), as irradiações com lasers infravermelho e visível podem ter induzido a uma maior expressão de genes como, por exemplo, os relacionados à intensidade da adesão entre as células, fundamental para a polarização dos blastômeros durante a compactação, para a segregação espacial da MCI e para a diferenciação do trofotoderma (FLEMING et al., 2001). A maior adesão intercelular foi relatada em células HeLa cultivadas *in vitro* após irradiações com luzes monocromáticas visíveis e infravermelhas. Além deste, outros inúmeros genes podem ter tido sua expressão elevada, como os relacionados à formação de estruturas de comunicação intercelular, fundamental na sobrevivência do embrião antes da implantação (WRENZYCKI et al., 1996), e à atividade enzimática da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, necessária à formação da blastocle (PRATHER & FIRST, 1988), que acontece entre os estágios de 32 e 64 células, e cuja expansão leva à eclosão do blastocisto (VAN SOOM et al., 1997). Também outro aspecto que pode estar envolvido é o metabólico, como já citado anteriormente. É sabido que embriões adaptam seu metabolismo à disponibilidade e às concentrações de substratos energéticos presentes no meio de desenvolvimento (LESSE, 1995). A maior produção de ATP pelo processo de fosforilação oxidativa, induzida pela irradiação com laser (HERBERT et al., 1989; KARU et al., 1995) pode ter ocorrido nos embriões estimulados, podendo ter sido utilizado, por exemplo, para um aumento na atividade da bomba de Na^+K^+ , acelerando a formação da blastocle, o que pode ter gerado maiores taxas de Bex e Becl, de forma a elevar a velocidade de desenvolvimento.

5.2 Experimento V - Efeitos da irradiação de embriões com laser infravermelho (780 nm) e visível (660 nm) sobre a qualidade de blastocistos

O número total de células embrionárias tem sido utilizado com frequência para avaliar a qualidade do embrião produzido *in vitro* (VIUFF et al., 2001; THOMPSON, 1997; ENRIGHT et al., 2000) e é claramente influenciado pelo ambiente de desenvolvimento no qual está inserido (KNIJN et al. 2003).

Neste experimento, a qualidade dos blastocistos produzidos ao sétimo dia de cultivo *in vitro*, avaliada por meio do total de células embrionárias neles presentes, não foi afetada após a irradiação com os lasers infravermelho e visível durante 30, 60, 120 e 180 seg. Apesar da ausência de diferenças estatísticas, observamos os embriões dos grupos tratados com laser infravermelho durante 30, 60 e 120 seg. apresentaram menor quantidade total de células em relação ao controle, enquanto que o grupo tratado durante 180 seg. mostrou maior quantidade em relação ao seu respectivo controle. Os resultados mostram, numericamente, que pode ter havido um efeito benéfico da irradiação infravermelha na qualidade dos embriões, pois no maior tempo de irradiação proposto, verificou-se uma maior quantidade no número total de células embrionárias comparado ao grupo controle, mesmo sem diferença estatística. No entanto, não se pode afirmar que este efeito foi dose-dependente, pois seria necessário que este efeito fosse proporcional ao aumento no tempo de irradiação. Da mesma maneira, os grupos tratados com laser visível, em todos os tempos de tratamento adotados, não mostraram diferenças no número de células embrionárias em relação aos grupos controle. No entanto, nota-se que nos grupos de embriões tratados durante 30, 60 e 180 seg., o número de células presentes foi maior em relação aos não irradiados. Apesar da ausência de diferenças estatísticas entre grupos controle e tratados, notamos que os resultados deste experimento estão de acordo com as hipóteses que envolvem o mecanismo de ação do laser de baixa potência. Segundo Karu et al., (1996), a recepção do foto-sinal por moléculas específicas na célula se traduz em reações bioquímicas no citoplasma e na membrana celular aumentando, em última instância, em uma elevação na síntese de DNA e RNA. Na espécie bovina, o desenvolvimento embrionário inicial é dependente do RNAm transcrito durante o crescimento do oócito, mas a partir do estágio de 8 a 16 células, esse controle

passa a ser exercido pelo genoma embrionário ativo (LONERGAN et al., 2003). Sabe-se que o ambiente de cultivo onde se desenvolve o embrião é capaz de alterar os padrões de expressão do RNAm de genes importantes no desenvolvimento embrionário, como os relacionados à formação de junções gap, à apoptose, ao estresse oxidativo, à diferenciação celular, dentre outros (LONERGAN et al., 2006), os quais estão intimamente relacionados com a qualidade do blastocisto e sua quantidade de blastômeros. A irradiação, portanto, pode ter oferecido suporte para o desenvolvimento celular embrionário, refletido pelos maiores índices numéricos do total de células dos embriões dos grupos irradiados em relação ao controle. Este efeito poderia acarretar em consequências posteriores, já que tem sido claramente demonstrado que proporções reduzidas da massa celular interna de blastocistos produzidos *in vitro* são indicativas de viabilidade reduzida e podem causar baixas taxas de gestação (IWASAKI et al., 1990; WILLADSEN & POLGE, 1981).

Um outro aspecto que consideramos é que o suposto efeito apoptótico que as irradiações com laser de baixa potência poderiam exercer nas células, por meio da produção de EROs (CALLAGHAN et al.; 1996; GROSSMAN et al., 1998), poderia não estar ocorrendo nos embriões irradiados. A apoptose é um processo que acontece em mórulas e blastocistos, normalmente com o objetivo de eliminar células anormais (HARDY, 1999) e está relacionada com o número total de células embrionárias (HARDY, 1997). No entanto, a presença de determinados fatores no ambiente de cultivo de embriões bovinos pode influenciar a incidência de apoptose (BYRNE et al., 1999), como por exemplo, uma geração de EROs elevada (NASR-ESFAHANI & JOHNSON; GOTO et al., 1993). Na maioria dos grupos irradiados com os lasers, a tendência na maioria dos grupos foi aumentar o número de células, mesmo sem a constatação de diferenças estatísticas significativas.

5. Conclusões

Diante dos resultados obtidos nos experimentos, pode-se concluir que:

- A produção embrionária ao sétimo dia de cultivo *in vitro* não foi afetada após a irradiação de embriões ao terceiro dia de cultivo *in vitro* com laser infravermelho (semicondutor operando em 780 nm) durante 30, 60, 120 e 180 segundos.

- A irradiação com laser visível (semicondutor operando em 660 nm) durante 30 segundos em embriões ao terceiro dia de cultivo *in vitro*, prejudicou a produção embrionária ao sétimo dia de cultivo.

- A irradiação com laser semicondutor operando em 780 nm (infravermelho) durante 30, 60, 120 e 180 segundos, em embriões ao terceiro dia de cultivo *in vitro*, não alterou a cinética de desenvolvimento embrionário.

- A irradiação com laser semicondutor operando em 660 nm (visível) durante 60 segundos, em embriões ao terceiro dia de cultivo *in vitro*, acelerou a cinética de desenvolvimento embrionário.

- A qualidade de blastocistos ao sétimo dia de cultivo *in vitro*, avaliada por meio do total de células embrionárias neles presentes, não foi alterada após a irradiação com os lasers infravermelho e visível durante 30, 60, 120 e 180 segundos ao terceiro dia de cultivo *in vitro*.

REFERÊNCIAS

BRISON, D.R.; LEESE, H.J. Blastocoele cavity formation by preimplantation rat embryos in the presence of cyanide and other inhibitors oxidative phosphorylation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.101, p.305-309, 1994.

BAKEEVA, L.E.; MANTEIFEL, V.M.; RODICHEV, E.B.; KARU, T. Formation of giant mitochondria in human blood lymphocytes after He-Ne laser irradiation. **Molekuliarnaia Biologiia (Moskva)**, v.27, p. 608-617, 1993.

BANZATTO, D.A.; KRONCA, S.N. **Experimentação Agrícola**. Ed. Funep, Jaboticabal, FCAV-UNESP, 4^a ed. p.237, 2006.

BAVISTER, B.D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. **Human Reproduction**, v.1, p.91-148, 1995.

BEEHLER, B.C.; PRZYBYSZEWSKY, J.; BOX, H.B., KULESZ-MARTIN, M.F. Formation of 8 hydroxydeoxyguanosine within DNA of mouse keratinocytes exposed in culture to UVB and H₂O₂. **Carcinogenesis**, v.13, p. 2003-2007, 1992.

BENOS, D.J.; BALABAN, R.S. Energy requirements of developing mammalian blastocysts for active ion transport. **Biology of Reproduction**, v.23, p.941-947, 1980.

CALLAGHAN, A.; RIORDAN, C.; GILMORE, W.S.; MCINTYRE, I.A.; ALLEN, J.A.; HANNINGAN, B.H. Reactive oxygen species inducible by low-intensity laser radiation parameters. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.19, p.201-206, 1996.

CORCORAN, D.; FAIR, T.; PARK, S.; RIZOS, D.; PATEL, O. V.; SMITH, G. W.; COUSSENS, P.M.; IRELAND, J.J.; BOLAND, M.P.; EVANS, A.C.O.; LONERGAN, P. Suppressed expression of genes involved in transcription and translation in *in vitro* compared with *in vivo* cultured bovine embryos. **Reproduction**, v.131, p.651-660, 2006.

ECKER, D.J.; STEIN, P.; XU, Z.; WILLIAMS, C.J.; KOPF, G.S.; BIKER, W.B.; ABEL, T.; SCHULTZ, R.M. Long-term effects of culture of preimplantation mouse embryos on behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.101, p.1595-1600, 2004.

FERNANDEZ-GONZALEZ, R.; MOREIRA, P.; BILBAO, A.; JIMENÉZ, A.; PÉREZ-CRESPO, M.; RAMIREZ, M.A.; DE FONSECA, F.R.; PINTADO, B.; GUTIERREZ-ADÁN, A. Long-term effects of *in vitro* culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.101, p.5880-5885, 2004.

FRIEDMANN, H.; LUBART, R.; LAULICHT, I. A possible explanation of laser-induced stimulation. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v.11, p. 87–95, 1991.

GARDNER, D.K. Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. **Theriogenology**, v.49, p.83-102, 1998.

GARDNER, D.K.; LANE, M. The 2-cell block in CF-1 mouse embryos is associated with an increase in glycolysis and a decrease in tricarboxylic acid (TCA) cycle activity: alleviation of the 2-cell block is associated with the restoration of *in vivo* metabolic pathway activity. **Biology of Reproduction**, v.49, n.1, p.52, 1993.

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

GROSSMAN, N.; SCHNEID, N.; REUVENI, H.; HALEVY, M.D.; LUBART, R. 780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.22, p.212–218, 1998.

GUÉRIN, P.; MOUATASSIM, S.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the preimplantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**, v.7, n.2, p.175-189, 2001.

HERBERT, K.E.; BHUSATE, L.L.; SCOTT, D.L, DIAMANTOPOLOS, C. Effect of laser light at 820 nm on adenosine nucleotide levels in human lymphocytes. **Lasers in the Life Sciences**, v.3, p.37-46, 1989.

HILF, R.; MURANT, R.S.; NARAYANAN, U.; GIBSON, S.L. Relationship of mitochondrial function and cellular adenosine triphosphate levels to hematoporphyrin derivative-induced photosensitization in R3230AC mammary tumors. **Cancer Research**, v.46, n.1, p.211–217, 1986.

HOLM, P.; CALLESEN, H. *In vivo versus in vitro* produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. **Reproduction, Nutrition, Development**, v.38, p.579-544, 1998.

JOU, M.J.; JOU, S.B.; GUO, M.J.; WU, H.Y.; PENG, T.I. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Generation and Calcium Increase Induced by Visible Light in Astrocytes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1011: p.45–56, 2004.

KARU, T.I.; PYATIBRAT, L.V.; KALENDO, G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated *in vitro*. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v.27, p.219-233, 1995.

KARU, T.I.; PYATIBRAT, L.V.; TIFLOVA, O.A.; NIKOGOSIAN, D.M. Specificity of the lethal and mutagenic action of pico-second laser pulses of 532nm wave length. **Radiobiologia**, v. 28, n.4, p.499-502, 1988.

KARU, T.I. Photobiology of low-power laser effects. **Health Physics**, v.56, p.691-704, 1989.

KARU, T.I.; PYATIBRAT, L.; KALENDO, G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated *in vitro*. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v.27, n.3, p.219-223, 1995.

KARU T.I. **The science of low power laser therapy**. London: Gordon and Breach Science, 1998.

KHURANA, N.K.; NIEMANN, H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived *in vitro* or *in vivo*. **Biology of Reproduction**, v.62, p.847-856, 2000.

KREISLER, M.; CHRISTOFFERS, B.; AL-HAJ, H.; WILLERSHAUSEN, B.; HOEDT, B. Low level 809-nm diode laser-induced *in vitro* stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.30, p.365-369, 2002.

KRUIP, T.A.M.; DENDAAS, J.H.G. *In vitro* produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition and offspring. **Theriogenology**, v.47, p.43-52, 1997.

KUJAWA, J.; ZAVODNIK, L.; ZAVODNIK, I.; BUKO, V.; LAPSHYNA, A.; BRYSEWSKA, M. Effect of low-intensity (3.75-25 J/cm²) near-infrared (810 nm) laser radiation on red blood cell ATPase activities and membrane structure. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v.22, n.2, p.111-117, 2004.

LAZZARI, G.; WRENZYCKI, C.; HERMANN, D.; DUCHI, R.; KRUIP, T.; NIEMANN, H.; GALLI, C. Cellular and molecular deviations in bovine *in vitro*-produced embryos are related to the large offspring syndrome. **Biology of Reproduction**, v.67, p.767-75, 2002.

LEESE, H.J. Metabolism of the preimplantation mammalian embryo. **Oxford Reviews of Reproductive Biology**, v.13, p.35-72, 1991.

LEESE, H.J.; DONNAY, I.; THOMPSON J.G. Human assisted conception: a cautionary tale. Lessons from domestic animals. **Human Reproduction**, v.13, n.4, p.101–119, 1998.

LEHNINGER, A.L. Transporte de elétrons, fosforilação oxidativa e regulação da produção de ATP. In: **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, p.333, 1993.

LONERGAN, P.; FAIR, T.; CORCORAN, D.; EVANS, A.C.O. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**, v.65, p. 137-152, 2006.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; KANKA, J.; NEMCOVA, L.; MBAYE, A.M.; KINGSTON, WADE, M.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P. Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. **Reproduction**, v.126, p.337–346, 2003.

MANES, C.; LAI, M.C. Nonmitochondrial oxygen utilization by rabbit blastocysts and surface production of superoxide radicals. **Reproduction and Fertility**, v.104, p.69-75, 1995.

MANTEIFEL, V.M.; KARU, T.I. Ultrastructural changes in human lymphocytes under He-Ne laser radiation. **Lasers in the Life Sciences**, v.4, p.235-248, 1992.

NAKAYAMA, T.; NODA, Y.; GOTO, Y. Effects of visible light and others environmental factors on the production of oxygen radicals by hamster embryos. **Theriogenology**, v.41, p.499-510, 1994.

NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequent development. **Theriogenology**, v.53, p.21-34, 2000.

NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C.; LUCAS-HANN, A.; BRAMBRINK, T.; KUES, W.A.; CARNWATH, J.W. Gene expression patterns in bovine *in vitro*-produced and nuclear transfer-derived embryos and their implications for early development. **Cloning Stem Cells**, v.4, p.29-38, 2002.

OLIVEIRA, A.T.D.; LOPES, R.F.F.; RODRIGUES, J.L. Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced *in vitro* under varying embryo density conditions. **Theriogenology**, v.64, p.1559-1572, 2005.

ORIKASA, N.; KUSAKARI, H.; KAWASE, T.; SUZUKI, A. Effects of low power laser on bone: histopathological and cellular physiological study. **J Jap Prosthod Soc**, v.35, p.339–350, 1991.

ORON, U.; YAAKOBI, T.; ORON, A.; MORDECHOVITZ, D.; SHOFTI, R.; HAYAM, G.; DROR, U.; GEPSTEIN, L.; WOLF, T.; HAUDENSCHILD, C.; BEN HAIM, S. Low energy laser irradiation reduces formation of scar tissue following myocardial infraction in dogs. **Circulation**, v.103, p.296-301, 2001.

PARTRIDGE, R.J.; LEESE, H.J. Consumption of amino acids by bovine preimplantation embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v.8, p.945-950, 1996.

PASSARELLA, S.; CASAMASSIMA, E.; MOLINARI, S.; PASTORE, D.; QUAGLIARIELLO, E.; CATALANO, I.M.; CINGOLANI, A. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated *in vitro* by helium-neon laser. **FEBS Letters**, v.175, n.1, p.95-99, 1984.

PASSARELLA, S.; OSTUNI, A.; ATLANTE, A.; QUAGLIARIELLO, E. Increase in the ADP/ATP exchange in rat liver mitochondria irradiated *in vitro* by helium-neon laser. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.156, n.2, p.978-986, 1988.

PASTORE, D.; GRECO, M.; PETRAGALLO, V.A.; PASSARELLA, S. Increase in $\leftarrow H^+/e^-$ ratio of the cytochrome c oxidase reaction in mitochondria irradiated with helium-neon laser. **Biochem Mol Biol Int**, v.34, n.4, p.817-826, 1994.

PASTORE, D.; DI MARTINO, C.; BOSCO, G.; PASSARELLA, S. Stimulation of ATP synthesis via oxidative phosphorylation in wheat mitochondria irradiated with helium-neon laser. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v.39, n.1149-1157, 1996.

RIEF, S.; SINOWATZ, F.; STOJKOVIC, M.; EINSPANIER, R.; WOLF, E.; PRELLE, K. Effects of a novel co-culture system on development, metabolism and gene expression of bovine embryos produced *in vitro*. **Reproduction**, v.124, n.543-556, 2002.

RIEGER, D. Relationship between energy metabolism and development of early mammalian embryos. **Theriogenology**, v.37, p.75-93, 1992.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P.; LONERGAN P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, v.61, p.234-248, 2002a.

RIZOS D, LONERGAN P, BOLAND MP, ARROYO-GARCIA R, PINTADO B, DE LA FUENTE J AND GUTIERREZ-ADAN A. Analysis of differential mRNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems:

implications for blastocyst quality. **Biology of Reproduction**, v.66, p.589–595, 2002b.

RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-GARNALO, S.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. **Biology of Reproduction**, v.68, p.236-243, 2003.

RUSAKOV, D.A. Tridimensional structure of presynapse mitochondria in factoric experiments with cat brain exposed to low intensity laser radiation. **Radiobiologiya**, v.30, p.358-363, 1990.

SAS. **USER'S GUIDE: basic and statistic**. Cary, NC: SAS, p.1.686, 1995.

STADLER, I.; EVANS, R.; BS, KOLB, B.; NAIM, J.O.; NARAYAN, V.; BS, BUEHNER, N.; LANZAFAME, R.J. *In vitro* Effects of Low-Level Laser Irradiation at 660 nm on Peripheral Blood Lymphocytes. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.27, p.255–261, 2000.

TERVIT, H.R.; WHITTINGHAM, D.G.; ROWSON, L.E.A. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.30, p.493-497, 1972.

TESFAYE, D.; PONSUKSILI, S.; WIMMERS, K.; GILLES, M.; SCHELLANDER, K. A comparative expression analysis of gene transcripts in post-fertilization developmental stages of bovine embryos produced *in vitro* or *in vivo*. **Reproduction in Domestic Animals**, v.39, p.396-404, 2004.

THOMSON, J.L. Effects of inhibitors of carbohydrate metabolism on the development of preimplantation mouse embryo. **Experimental Cell Research**, v.46, p.252–262, 1967.

THOMPSON, J.G.; PARTRIDGE, R.J.; HOUGHTON, F.D.; COX, C.I.; LEESE, H.J. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by *in vitro* derived bovine embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.106, p.299–306, 1996.

THOMPSON, J.G.; MCNAUGHTON, C.; GASPARRINI, B.; MCGOWAN, L. T.; TERVIT, H.R. Effect of inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation during compaction and blastulation of bovine embryos cultured *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.118, p.47–55, 2000.

THOMPSON, J.G.; SHERMAN, A.N.M.; ALLEN, N.W.; MCGOWAN, L.T.; TERVIT, H.R. Protein content, synthesis and uptake in pre-elongation stage bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.50, p.139–145, 1998.

VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M.T.; DE KRUIF, A. Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in *in vitro*-produced bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.47, n.1, p.47-56, 1997.

VAN WAGTENDONK-DE-LEEuw, A.M.; MULLAART, E.; DE ROOS, A.P.; MERTON, J.S.; DENDAAS J.H.G.; KEMP, B.; DE RUIGH, L. Effects of different reproduction techniques: AI, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. **Theriogenology**, v.53, p.575–597, 2000.

YAMADA K. Biological effects of low power laser irradiation on clonal osteoblastic cells (MC3T3-E1). **Journal of Japanese Orthopedic Association**, v.65, p.787–799, 1991.

YAMAMOTO, M.; TAMURA, K.; HIRATSUKA, K.; ABIKO, Y. Stimulation of MCM3 gene expression in osteoblast by low level laser irradiation. **Lasers in Medical Science**, v.16, p.213–217, 2001.

YU, W.; NAIM, J.O.; MCGOWAN, M.; IPPOLITO, K.; LANZAFAME, R.J. Photomodulation of oxidative metabolism and electron chain enzymes in rat liver mitochondria. **Photochemistry and Photobiology**, v.66, p.866-871, 1997.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; CARNWATH, J.W.; NIEMANN, H. Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. **Molecular Reproduction and Development**, v.53, p.8-18, 1999.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; KESKINTEPE, L.; MARTINS, A.; SIRISATHIEN, S.; Brackett, B.; NIEMANN, H. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. **Human Reproduction**, v.16, n.893-901, 2001.

WRENZYCKI, C.; HERMANN, D.; LUCAS-HAHN, A.; KORSawe, K.; LEMME, E.; NIEMANN, H. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from *in vitro* procedures and their implications for development. **Reproduction, Fertility and Development**, v.17, p.23-35, 2005.

APÊNDICES

APÊNDICE A - OBTENÇÃO E MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS

Exceto quando mencionado, os reagentes e meios foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, EUA).

Todos os oócitos utilizados nos experimentos foram obtidos de ovários de vacas mestiças, coletados no frigorífico Bertin Ltda (Lins-SP), situado próximo ao laboratório onde o trabalho foi desenvolvido. Após a coleta, os ovários foram rapidamente transportados até o laboratório em solução salina estéril mantida em 25 a 30°C. De 4 a 5 horas após o início da coleta, folículos de 2 a 8 mm de diâmetro foram puncionados com agulha 18G acoplada à seringa de 20 mL e o líquido resultante foi depositado em tubos cônicos de 50 mL, permanecendo em repouso por 20 minutos. Após este período, o sedimento de cada tubo foi transferido para placa de Petri (90 mm) e diluído no próprio líquido folicular para recuperação dos oócitos. Sob visualização em microscópio estereoscópico, COCs (complexos *cumulus*-oócitos) foram classificados e selecionados de acordo a morfologia de seu citoplasma e células do *cumulus*: grau I: *cumulus* compacto com várias camadas de células, citoplasma homogêneo e complexo *cumulus*-oócito (COC) claro e transparente; grau II: 4-5 camadas de *cumulus*, aparência irregular e zona escura na periferia do oócito; grau III: 2-3 camadas de *cumulus*, citoplasma irregular e COC escuro; atresico: células do *cumulus* expandidas e desnudo: ausência de células do *cumulus* (LOOS et al., 1991; LONERGAN et al., 1992) (Figura 1A). Foi priorizada a seleção de oócitos grau I, II e III, de forma a se obter uma população homogênea dentro de cada tratamento, para que se pudesse isolar ao máximo os possíveis efeitos do laser, sem a interferência da qualidade dos oócitos.

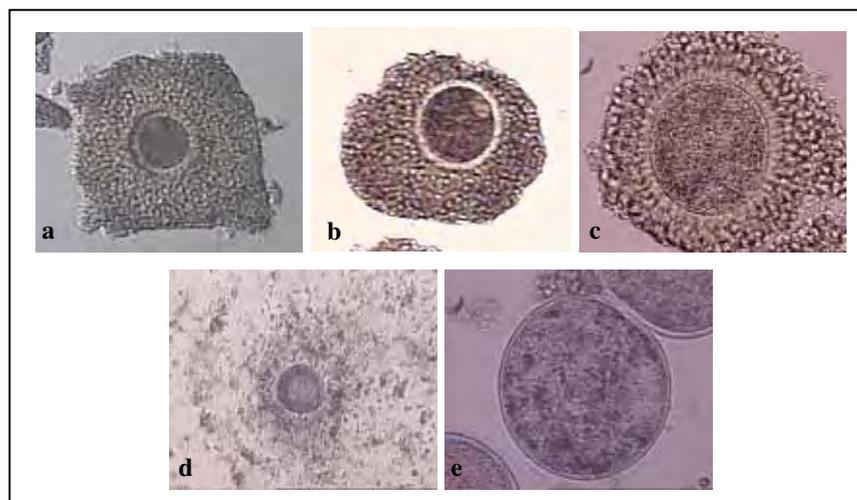


Figura 1A. Classificação dos complexos cumulus-oócitos de bovinos de acordo com sua morfologia, sob microscópio estereoscópico. (a) grau I; (b) grau II; (c) grau III; (d) atrésico e (e) desnudo.

Após a seleção, as estruturas foram lavadas duas vezes em meio TCM 199 (GIBCO BRL; Grand Island, NY, EUA) suplementado com Hepes, 10% de soro fetal bovino (SFB), 0,20 mM de piruvato de sódio e 83,4 μ g/mL de sulfato de amicacina (Instituto Biochimico, RJ, BR). Em seguida, grupos de 20 a 25 oócitos foram colocados para a maturação em gotas de 100 μ L de meio TCM 199 acrescido de 10% de SFB, 1 μ g/mL FSH (Pluset, Calier, Osasco, SP, BR), 50 μ g/mL hCG (Vetecor, Calier, Juatuba, MG, BR) e estradiol (1 μ g/ml), 0,20mM de piruvato de sódio e 83,4 μ g/mL de sulfato de amicacina, cobertas com óleo mineral (Dow Corning Co., Midland, MI, EUA) e mantidas em incubadoras a 38,5°C em uma atmosfera gasosa de 5% de CO₂ com umidade saturada, durante 24 horas.

APÊNDICE B - ESPECIFICAÇÕES TÉCNICAS DO EQUIPAMENTO DE LASER E PARÂMETROS DE IRRADIAÇÃO

O aparelho de laser utilizado nos experimentos foi adquirido da Twin Laser (MM Optics[®] LTDA, São Carlos, São Paulo, Brasil). Seu meio ativador é o semicondutor, operando em modo de emissão contínuo. É composto de duas canetas emissoras, sendo uma para comprimento de onda de 660 nm (visível vermelho) e outra para 780 nm (infravermelho) (Figura 1B).



Figura 1B. Equipamento de Laser Twin Laser (MM Optics[®] LTDA, São Carlos, São Paulo, Brasil) utilizado nos experimentos. (a) painel frontal com visor indicando potência, tempo, dosagem e tipo de caneta; botões para seleção de funções e ajuste de parâmetros. (b) suporte em teflon adaptado com caneta emissora de laser infra-vermelha acoplada.

Os parâmetros de irradiação utilizados nos experimentos de todos os capítulos estão detalhados na Tabela 1B.

Tabela 1B. Especificações técnicas do equipamento de laser Twin Laser (MM Optics® LTDA, São Carlos, São Paulo, Brasil) e padrões de irradiação utilizados nos experimentos.

Características	Laser Visível	Laser Infravermelho
Comprimento de onda (λ)	660nm	780nm
Diâmetro do spot	4mm ² (0,04cm ²)	4mm ² (0,04cm ²)
Modo de aplicação	Contato direto sobre a placa	Contato direto sobre a placa
Número de aplicações	Única	Única
Tempo de exposição pontual	30, 60, 120, 180 seg.	30, 60, 120, 180 seg.
Potência da caneta	40mW (0,04W)	50mW (0,05W)
Irradiância (densidade de potência)	1W/cm ²	1,25W/cm ²
Energia total	1,2J; 2,4J; 4,8J; 7,2J	1,5J; 3J; 6J; 9J
Fluência (densidade de energia)	30J/cm ² , 60J/cm ² , 120J/cm ² , 180J/cm ²	37,5J/cm ² , 75J/cm ² , 150J/cm ² , 225J/cm ²

Para se obter o efeito máximo do laser sobre o inóculo, o recomendado é que se posicione o “spot” do feixe de saída da caneta emissora o mais próximo possível do inóculo. A fim de se manter a distância fixa durante todo o tempo de irradiação em todos os tratamentos foi confeccionado um suporte em teflon que permite o posicionamento da caneta em altura regulável e de forma que a irradiação ocorresse de baixo para cima, sem a necessidade de remover a tampa da placa de Petri, mantendo ao máximo a atmosfera interna na placa (Figura 1Bb; 2B). Dessa forma os padrões de irradiação propostos puderam ser preservados durante todos os experimentos.

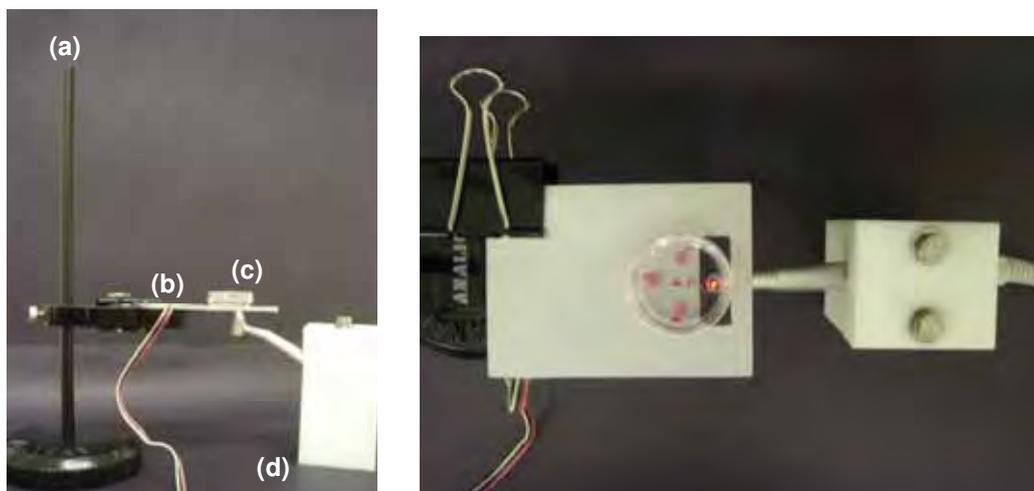


Figura 2B. Método de aplicação do laser adotado nos experimentos. (a) haste para fixação da platina aquecedora. (b) platina aquecedora. (c) placa de cultivo contendo estruturas a serem irradiadas. (d) suporte em teflon adaptado com caneta emissora de laser acoplada.

APÊNDICE C – FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS

Exceto quando mencionado, os reagentes e meios foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, EUA).

Após 24 horas do início do cultivo, os oócitos foram retirados de suas gotas de maturação e lavados uma vez em meio TALP-HEPES (TALP – Tyrode's Albumin Lactate Piruvate - suplementado com hepes ácido, 0,2 mM de piruvato de sódio e 83,4 µg/mL de amicacina [Instituto Biochimico, RJ, BR]), e outra vez em meio TALP-FIV (TALP suplementado com 30 µg/mL de heparina, 18 µM de penicilamina, 10 µM de hipotaurina, 1,8 µM de epinefrina, acrescentado de 0,2 mM de piruvato, 83,4 µg/mL de amicacina e 6 mg/mL de albumina sérica bovina). Após a descongelação (37°C por 30 segundos), o sêmen foi preparado por duas centrifugações, de 5 minutos cada, a uma força centrípeta de 200 xg, sendo na primeira utilizado o meio TALP-HEPES e na segunda o meio TALP-FIV. Foram recuperados 50 µL do sedimento, os quais foram depositados em um microtubo contendo 20 µL de meio TALP-FIV. Deste volume total, foram retiradas amostras para avaliação da motilidade e concentração espermáticas e então a concentração final foi ajustada para 25×10^6 espermatozóides vivos/ mL. Em seguida doses inseminantes de 1×10^6 espermatozóides vivos/ gota foram utilizadas para fecundar os oócitos. A co-incubação de espermatozóides e o oócitos foi conduzida em incubadora a 38,5°C em uma atmosfera gasosa de 5% de CO₂ com umidade saturada, durante 24 horas.

Durante todos os experimentos, as fertilizações foram procedidas com o sêmen de um único animal e partidas equivalentes.

APÊNDICE D – CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

Exceto quando mencionado, os reagentes e meios foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, EUA).

Com 18 a 24 horas pós-fertilização (hpf), os prováveis zigotos foram retirados de suas gotas de fertilização e pipetados manualmente para remoção das células do cumulus. Em seguida foram lavados duas vezes em meio TALP-HEPES (TALP suplementado com hepes ácido, 0,2 mM de piruvato de sódio e 83,4 µg/mL de amicacina [Instituto Biochimico, RJ, BR]) e uma vez em meio de cultivo (meio SOF contendo). Depois de lavadas, as estruturas foram destinadas para cultivo em gotas de 100 µL de meio SOF -Synthetic Oviduct Fluid (TERVIT et al., 1972) - cobertas com óleo mineral, em estufas a 38-39°C e 5% de CO₂ durante, permanecendo até o 7º dia pós FIV.

Durante os sete dias de CIV foram realizados dois “feedings”, ou seja, substituição de 50% do meio SOF por igual volume de meio novo (recém-preparado), nos dias três e cinco, havendo, no último, a suplementação de 0,5 mM de glicose.