

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA -
AMAZÔNIA ORIENTAL
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL**

CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

Magna Andreoti

**PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS: USO DA
GLUTATIONA DURANTE O PROCESSO DE LAVAGEM E
CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA**

Belém
2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA –
AMAZÔNIA ORIENTAL
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

Magna Andreoti

**PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS: USO DA
GLUTATIONA DURANTE O PROCESSO DE LAVAGEM E
CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciência Animal da Universidade Federal do Pará, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental e da Universidade Federal Rural da Amazônia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de concentração: Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Otávio Mitio Ohashi

Belém
2007

Biblioteca Centro de Ciências Agrárias / UFPA, Belém-PA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) –

Andreoti, Magna

Eficiência da glutathione (GSH) na capacitação de espermatozoides utilizados em fertilização in vitro (FIV) de oócito bovino / Magna Andreoti; orientador, Otávio Mitio Ohashi, - 2007.

Dissertação (Mestrado) – Curso de Mestrado em Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias, Núcleo de Estudos em Ciência Animal, Universidade Federal do Pará, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- Amazônia Oriental, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2007.

1. Bovino – Inseminação artificial. 2. Bovino - Reprodução. 3. Fertilização in vitro. 4. Reprodução animal. I. Título.

CDD 636.208245

Magna Andreoti

**PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS: USO DA
GLUTATIONA DURANTE O PROCESSO DE LAVAGEM E
CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciência Animal da Universidade Federal do Pará, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental e da Universidade Federal Rural da Amazônia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de concentração: Produção Animal.

Belém-PA: 16 / 11 / 2007

Orientador: _____

Prof. Dr. Otávio Mitio Ohashi - UFPA

Banca Examinadora:

Prof^ª Dra Simone do S. D. dos Santos – UFPA

Prof^ª Dra Cleusa Yoshiko Nagamachi – UFPA

Prof^ª Dra Maria Auxiliadora P. Ferreira – UFPA

Belém

2007

Ao meu pai José Righi Andreoti

A minha mãe Remi Teleken Andreoti (em memória)

AGRADECIMENTOS

Existem pessoas em nossas vidas que nos deixam felizes pelo simples fato de terem cruzado o nosso caminho. Algumas percorrem ao nosso lado, vendo muitas luas passarem, mas outras apenas vemos entre um passo e outro. A todas elas chamamos de amigo. Há muitos tipos de amigos. Talvez cada folha de uma árvore caracterize um deles. Os primeiros que nascem do broto é o amigo pai e a mãe, que nos mostram o que é ter vida.

Depois vem o amigo irmão, ou no meu caso irmã, com quem dividimos o nosso espaço para que ele floresça como nós. Passamos a conhecer toda a família de folhas, a qual respeitamos e desejamos o bem. O destino ainda nos apresenta outros amigos, o qual não sabia que iam cruzar o nosso caminho. Muitos desse são designados amigos do peito, do coração. São sinceros, são verdadeiros. Sabem quando não estamos bem, sabem o que nos faz feliz.

Mas também há aqueles amigos por um tempo, talvez umas férias ou mesmo um dia ou uma hora. Esses costumam colocar muitos sorrisos na face, durante o tempo que estamos perto. Falando em perto, não podemos nos esquecer dos amigos distantes, que ficam nas pontas dos galhos, mas que quando o vento sopra, aparecem novamente entre uma folha e outra.

O tempo passa, o verão se vai, o outono se aproxima, e perdemos algumas de nossas folhas. Algumas nascem num outro verão e outras permanecem por muitas estações. O que nos deixa mais felizes é quando as folhas que caíram continuam por perto, continuam alimentando as nossas raízes com alegria. Lembranças de momentos maravilhosos enquanto cruzavam o nosso caminho. Desejo a você folha da minha árvore, paz, amor, sucesso, prosperidade... Hoje e sempre.

Simplesmente porque cada pessoa que passa por minha vida é única. Sempre deixa um pouco de si e leva um pouco de mim. Há, no entanto os que levaram muito, mas não há os que não deixaram nada. Está é a maior responsabilidade de nossa vida e a prova evidente do que duas almas não se encontram por acaso.

Obrigada pela oportunidade de ter conhecido cada pessoa que de alguma forma fez e faz a diferença em minha vida.

Venho aqui agradecer não só aos que me ajudaram efetivamente na construção dessa Dissertação, mas aos amigos e colegas que compartilharam comigo idéias, fomentaram discussões, que me trouxeram pérolas poéticas, que construíram frases espirituosas e fortuitas

sobre os rascunhos. Àqueles que me ajudaram, de alguma forma, no meu percurso nesse período e, principalmente, a seguir adiante com a escritura.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Em especial agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida.

Ao meu pai José Righi Andreoti pelo incentivo, por ter depositado em mim muita confiança e amor.

A minha irmã Maristela Andreoti, pelo incentivo, amor e pelas palavras carinhosas.

Agradeço muito a minha família por consideração Cordeiro e Lima que me acolheu como membro de sua família, me tratando com igualdade, dignidade e trazendo muito conforto ao meu coração, promovendo um ambiente familiar de muita paz, esperança e muitas alegrias.

A Mestre e grande amiga Marcela da Silva Cordeiro, por ter contribuído fundamentalmente para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao meu orientador, pessoa de caráter inigualável, Professor Dr. Otávio Mitio Ohashi, agradeço pela confiança em mim depositada e oportunidade de ser parte da equipe do Laboratório de Fecundação *In Vitro* da UFPA.

A família Paranaense, Righi e Andreoti que apesar da distância, sempre me apoiaram em todas as minhas decisões.

A Flávia Biondi, pela dedicação e amizade.

A Moysés dos Santos Miranda, pela cooperação e sábias opiniões para a melhora e concretização deste trabalho.

A Profª Dra. Simone do Socorro Damasceno dos Santos, pelo apoio e cooperação.

A todas as pessoas do Laboratório de Fecundação *In Vitro* da Universidade Federal do Pará, pela ajuda, amizade, incentivo e cooperação.

A Universidade Federal do Pará e seus funcionários.

A Central de Genética Campo de Boi pelo apoio financeiro.

“O primeiro passo para conseguirmos o que
queremos na vida é decidirmos o que queremos”.

(Bem Stein)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da glutatona (GSH – 0,3mg/mL), no processo de separação, lavagem e capacitação espermática sobre a taxa de produção *in vitro* de embriões bovinos. O sêmen de um touro foi separado através de gradientes de Percoll e centrifugados duas vezes em meio de fecundação *in vitro* (lavagem). Espermatozoides foram capacitados in meio de FIV durante 1 h em estufa úmida a 38,5°C e 5% de CO₂. Os grupos experimentais foram: **Controle** (não possui a etapa de lavagem; **Grupo 1:** sem GSH nas três etapas; **Grupo2:** GSH somente na capacitação; **Grupo3:** GSH somente na separação e na lavagem (primeira lavagem); **Grupo 4:** GSH em todas as etapas. Oócitos provenientes de abatedouro foram maturados *in vitro* e fertilizados após as preparações feitas no sêmen. Os embriões foram cultivados durante 7 dias com análise da clivagem no 2º dia, taxa de blastocisto e número total de células embrionárias no 7º dia. As taxas de desenvolvimento embrionário foram analisadas pelo qui-quadrado (χ^2) e a qualidade embrionária pela ANOVA através do programa Bio Estat 3.0 (AYRES, *et al.*, 2003) com nível de significância de 5%. Não houve diferença estatística efeito do uso da GSH nas diferentes etapas do processo de preparação espermática sobre as taxas de clivagem, blastocisto e eclosão (**Grupo Controle:** 52, 35 e 50%; **Grupo 1:** 60, 37 e 44%; **Grupo 2:** 57, 40 e 50; **Grupo 3:** 56, 37 e 51%; **Grupo 4:** 47, 30 e 48%, respectivamente, $p>0,05$). Também não foi observado diferença estatística quanto ao número de células embrionárias (**Grupo Controle:** 30,9±21,87, **Grupo 1:** 57,8±18,26; **Grupo 2:** 66,2±20,14; **Grupo 3:** 62,1±22,48; **Grupo 4:** 76,7±29,28; $p>0,05$).

ABSTRACT

The aim of this work was evaluated the effect of Glutathione addition (GSH – 0.3mg/mL) in the semen separation, washing and capacitation steps on the bovine *in vitro* embryo production. Semen from one only bull was separated with Percoll and centrifugated twice with *in vitro* fertilization (IVF) medium (washing). Spermatozoa were capacitated in IVF medium during 1 h in 5% CO₂ incubator at 38,5°C. Experimental groups were: Control – it was not supplemented with GSH in separation and washing and capacitation was excluded; **Group 1:** without GSH in all steps; **Group 2:** GSH supplementation just in the capacitation; **Group 3:** GSH supplementation in the separation and washing steps (first washing only); **Group 4:** GSH supplementation in all steps. Bovine oocytes collected at slaughterhouse were *in vitro* matured and fertilized after semen preparations. Embryos were cultured during seven days with cleavage being analysed at day 2 and blastocyst rates and total embryo cell number (quality) at day7. Embryo rates were evaluated with chi-square test (χ^2) and embryo quality with ANOVA in the software Bio Estat 3.0 (AYRES, et al., 2003) at significance level of 5%. There was not effect of the GSH supplementation in different steps of semen preparation ($p>0,05$) on cleavage, blastocysts and hatching rates (**Control Group:** 52%, 35% and 50%, respectively; **G1:** 60%, 37% and 44%, respectively; **G2:** 57%, 40% and 50%, respectively; **G3:** 56%, 37% and 51%, respectively; **G4:** 47%, 30% and 48%, respectively). Moreover, it was not observed effect on mean (\pm SD) of embryo total cell number (Control: 30,9 \pm 21,87, Group 1:57,8 \pm 18,26; Group 2:66,2 \pm 20,14; Group 3:62,1 \pm 22,48; Group 4:76,7 \pm 29,28; $p>0,05$).

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
μL	Microlitro
μM	Micromolar
AGPI	Ácidos Graxos Polinsaturados
μg	Micrograma
BSA	Albumina Sérica Bovina
CAT	Catalase
CCO	Complexo Cumulus-Ovócito
CG	Células da Granulosa
CIV	Cultivo <i>In Vitro</i>
CO ₂	Gás Carbônico
CR ₂	Charles Rosenkranss
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
<i>et al</i>	<i>et alli</i> (e colaboradores)
FIV	Fecundação <i>In Vitro</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
g	Gramas
G	Gravidade
GSH	Glutationa
GPx	Glutationa Peroxidase
GR	Glutationa Redutase
h	Horas

Hepes	<i>N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid</i>
ITS	Insulina, Transferrina, Selênio
LH	Hormônio Luteinizante
M II	Metáfase II
mg	Miligrama
µg	Micrograma
MIV	Maturação <i>In Vitro</i>
mL	Mililitro
NOS	Óxido Nítrico Sintetase
OPU	<i>Ovum Pick-Up</i>
PIVE	Produção <i>In Vitro</i> de Embriões
PKA	Proteína Kinase A
RL	Radial livre
RNA	Ácido Ribonucléico
SFB	Soro Fetal Bovino
SOD	Superóxido Dismutase
SOF	Fluído Sintético do Oviduto
SPTZ	Espermatozóide
TALP	Tyrodes, Albumina, Lactato e Piruvato
TCM	Meio de Cultivo de Tecidos
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	
RESUMO.....	
ABSTRACT.....	
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES	14
1.1.1 Fecundação.....	15
1.1.2 Bicarbonato	16
1.1.3 Albumina.....	16
1.1.4 Íons Cálcio.....	17
1.1.5 Glicosaminoglicanos.....	17
1.2 LESÕES CELULARES CAUSADAS PELOS RADICAIS LIVRES.....	18
1.3 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E FUNÇÕES DA GLUTATIONA	21
2 OBJETIVOS.....	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 OBTENÇÃO DOS OVÁRIOS.....	26
3.3 MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i>	27
3.4 SEPARAÇÃO E CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA	28
3.5 FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i>	29
3.6 CULTIVO <i>IN VITRO</i> DOS EMBRIÕES.....	29
3.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	30
3.8 AVALIAÇÃO DA FECUNDAÇÃO E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO.....	30
.....	30
3.8.1 Fecundação e Polispermia	30
3.8.2 Desenvolvimento Embrionário.....	31
3.8.3 Avaliação da Qualidade Embrionária	31
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
5 RESULTADOS	32
5.1 FECUNDAÇÃO E POLISPERMIA	32
5.2 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO	33
5.3 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE EMBRIONÁRIA.....	34
6 DISCUSSÃO	35
7 CONCLUSÕES.....	37
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

1 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem sido utilizada como base para diferentes estudos relacionados à biotecnologia da reprodução, tanto em animais como em humanos (PALMA & BREM, 1993). Na última década, a PIVE em bovinos tornou-se importante ferramenta comercial para o melhoramento genético do rebanho mundial e brasileiro, sendo amplamente utilizada para esse fim (RODRIGUES *et al.*, 1999; VITROGEN, 2004).

A busca pelo maior aproveitamento dos gametas femininos faz com que as pesquisas no âmbito das biotecnologias reprodutivas procurem desenvolver sistemas cada vez mais eficientes visando uma maior produção de embriões viáveis (VAN DE VELDE *et al.*, 1999). Neste sentido, varias pesquisas vêm sendo desenvolvidas a fim de propiciar condições de maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário *in vitro* mais adequados (MATOS *et al.*, 1997; ASSUMPCÃO *et al.*, 2002).

Sabe-se que a concentração de oxigênio no trato reprodutivo das fêmeas é 1/3 (3 a 9% de O₂) da que é encontrada na maioria dos sistemas de PIVE (20% de O₂) (MASTROIANNI & JONES, 1965). Alguns estudos demonstraram que o cultivo *in vitro* de embriões sob baixas concentrações de oxigênio (O₂) possibilita uma menor produção de radicais livres do que em ambientes com altas concentrações (NARS ESFAHANI *et al.*, 1990; LIU Z & FOOT, 1995).

Assim como relatado por ALI *et al.* (2003), um balanço entre as concentrações de radicais livres e de substâncias conhecidas como antioxidantes é de suma importância durante o processo de capacitação dos espermatozóides (SPTZ). Além disso, o fato de o SPTZ possuir uma área citoplasmática bastante reduzida faz com que armazene menores quantidades de antioxidantes, como é o caso da glutathiona (GSH) (MATOS *et al.*, 1997; WOLF, 2005), um importante tri-peptídeo responsável pela proteção das células contra danos oxidativo causados pelos radicais livres (ALI *et al.*, 2003; DREVET, 2006). Nesse sentido, a avaliação dos efeitos da adição da GSH ao meio de separação, lavagem e capacitação espermática sobre a capacidade de fecundação e, conseqüentemente, desenvolvimento embrionário *in vitro* é fundamental.

1.1 PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES

Cientistas interessados no estudo de aspectos relacionados à reprodução e ao desenvolvimento de organismos superiores iniciaram os primeiros ensaios com a finalidade de estabelecer metodologias que permitissem a manipulação de embriões. No entanto, dificuldades relativas à compreensão das necessidades nutricionais e as limitações impostas pelas características físico-químicas dos meios utilizados para cultivar esses embriões, consistiam em barreiras técnicas a serem superadas (BRACKETT *et al.*, 1982).

Foi no início do século XX, juntamente com o desenvolvimento da química, que a embriologia passou por progressos significativos, pois havia a produção de meios de melhor qualidade, possibilitando desta forma, o sucesso de coleta e cultivo de embriões (BLANDAU, 1980, BRACKETT *et al.*, 1982).

No entanto, o marco na história da fecundação *in vitro* (FIV) ocorreu por volta de 1950, quando WESLEY WHITTEN propôs uma nova formulação para os meios de cultura, que passaria a ser utilizada tanto na coleta quanto no cultivo dos embriões, ampliando significativamente o número de embriões implantados com sucesso. WHITTEN desenvolveu um meio utilizando uma solução de Krebs-Ringer bicarbonato, suplementada com albumina sérica bovina, o qual foi capaz de promover as clivagens de um embrião de camundongo com uma célula até o estágio de blastocisto. Juntamente com WHITTEN, RALPH BRINSTER *apud* GONÇALVES (2002) iniciou uma linha de pesquisa para determinar quais as necessidades nutricionais de um embrião em cultura e, durante o processo, desenvolveu a técnica da cultura de embriões em micro gotas utilizada em vários laboratórios (HOGAN *et al.*, 1986, GONÇALVES *et al.*, 2002).

No final dos anos setenta surgiram os primeiros relatos de maturação *in vitro* (MIV) e FIV de oócitos bovinos sendo que a primeira FIV bem sucedida de oócitos maturados artificialmente foi creditada a IRITANI e NIWA, em 1977, no Japão. STEPTOE & EDWARDS (1978) produziram o 1º bebê de FIV humano. Em 1982, foi anunciado o nascimento do primeiro bezerro de FIV, porém com oócito ovulado (BRACKETT *et al.*, 1982).

PARRISH *et al.* em 1986 usaram a heparina para promover a capacitação espermática, possibilitando desta forma um incremento na produção de embriões. A partir daí a PIVE recebeu um grande impulso e em 1987, houve o nascimento de gêmeos bovinos produzidos totalmente sob condições artificiais (GONÇALVES *et al.*, 2002; ALVARENGA, 2005).

1.1.1 Fecundação

Em mamíferos, a fecundação compreende uma série de eventos biológicos que envolvem os gametas feminino e masculino. Mesmo que dentre as espécies haja algumas particularidades, em geral, a fusão dos gametas ocorre próxima à junção istmo-ampolar do oviduto (HUNTER, 1984).

Para que o gameta masculino seja capaz de fecundar o feminino, além de ser morfológicamente viável e maturo, deverá sofrer modificações funcionais e estruturais, eventos esses denominados de capacitação espermática (CARVALHO *et al.*, 2002; HAFEZ, 2004). A capacitação envolve múltiplas etapas onde acontece uma série complexa de eventos moleculares que ainda não foram totalmente elucidados (HAFEZ, 2004).

AUSTIN e CHANG no ano de 1951 foram os primeiros a documentar a necessidade de haver capacitação para que um espermatozóide estivesse apto a fecundar, no entanto, ainda hoje não se conhece exatamente todas as alterações que ocorrem neste processo. Acredita-se que um dos principais eventos ocorridos seja a remoção ou alteração de estabilizadores ou fatores protetores da membrana plasmática adquiridas durante o trânsito pelo epidídimo ou exposição ao plasma seminal, os quais levariam a membrana a uma condição propícia para a fecundação. No entanto irão adquirir a capacidade fecundante no trato reprodutor da fêmea (FERRARI, 1997; FLESCHE *et al.*, 2000).

Neste processo, também estão envolvidas mudanças bioquímicas e estruturais da membrana plasmática ligadas ao transporte de íons cálcio (ASSUMPÇÃO *et al.*, 2002). Algumas substâncias como bicarbonato, albumina, e os glicosaminoglicanos (heparina) desempenhariam um papel de desencadeadores do processo de capacitação espermática (SOUZA, 2003).

1.1.2 Bicarbonato

Este componente é considerado o desencadeador da capacitação, pois ativa diretamente uma adenilato ciclase SPTZ específica que então se ligaria a proteína kinase A (PKA). Esta via, ativa diretamente ou indiretamente o deslocamento de fosfolipídios levando a uma alteração da assimetria da membrana resultando em células espermáticas capacitadas.

A concentração de bicarbonato é baixa na cauda do epidídimo (<1mM), local onde ficam armazenados os SPTZ. No trato genital feminino, a concentração é na ordem de 15mM. Os níveis intracelulares de bicarbonato também podem aumentar via canais iônicos na membrana plasmática (FRESCH *et al.*; 2000; HAFEZ, 2004).

1.1.3 Albumina

A albumina está relacionada à extração do colesterol da membrana plasmática. Este processo ocorrerá em áreas restritas da membrana, havendo devido a isto, um deslocamento dos fosfolipídios, levando-os a um novo rearranjo. Nas espécies onde a membrana é rica em colesterol (humanos e bovinos) tais eventos não são evidenciados na mesma velocidade como nas espécies com um baixo nível (suínos e ovinos). Frente a isto, o tempo para capacitação varia, sendo verificada a necessidade de um maior tempo naquelas com altos níveis de colesterol na membrana (FRESCH *et al.*, 2000).

1.1.4 Íons Cálcio

O cálcio intracelular no espermatozóide tem um papel fundamental nos processos de capacitação, hiperatividade e reação acrossomal para a fecundação. Além disso, é o principal elemento para a motilidade flagelar e fusão da vesícula acrossomal. O aumento de cálcio interno é um passo essencial na via de sinalização da ZP₃ (uma das três glicoproteínas da zona pelúcida e espécie-específica), levando a reação acrossômica. O cálcio também possui uma importante função na regulação da motilidade hiperativada, tanto extra como intracelular, atuando principalmente no axonema (FRESCH *et al.*, 2000; GABALDI *et al.*, 2002).

1.1.5 Glicosaminoglicanos

Os glicosaminoglicanos são cadeias polissacarídeos, longas, não ramificadas, compostas por unidades dissacarídicas repetidas. Estas unidades dissacarídicas são formadas por uma N-acetilglicosamina ligada a um ácido urônico.

Possuem várias propriedades:

- São poliânions (carga negativa devido a presença de grupamentos SO_3^- e grupamentos carboxílico (CO_2));
- Forte comportamento hidrofílico;
- Retenção de íons positivos (ex: Na^+) junto com a água, colaborando na manutenção da arquitetura tecidual;

Poderiam atuar sobre a capacitação removendo os fatores decapacitantes ou por modificações diretas na membrana plasmática, induzindo um aumento na concentração de cálcio ou pela ativação da proteína Kinase dependente de AMPc (PKA) (FRESCH, *et al.*, 2000).

Todas essas modificações ainda não são totalmente compreendidas e ocorrem a nível molecular resultando em alterações morfológicas (reação acrossômica) e fisiológicas do gameta, o que o deixará apto para a fecundação (CARVALHO *et al.*, 2002).

Como o SPTZ, durante o período de maturação, perde grande parte de seu citoplasma e, conseqüentemente, parte dos antioxidantes endógenos que estão presentes em sua célula, fica vulnerável à ação de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que pode acarretar-lhe sérios danos, dentre eles, a diminuição da motilidade e viabilidade além do comprometimento da capacitação e da reação acrossômica (CARVALHO *et al.*, 2002).

O meio utilizado para promover a capacitação *in vitro*, deve aproximar-se das características do fluido presente no oviduto. É necessário que contenha substratos energéticos tais como o piruvato, lactato, glicose, um captador de colesterol (geralmente a albumina sérica), cálcio (Ca⁺⁺), concentrações baixas de potássio (K⁺) e fisiológicas de sódio (Na⁺).

Em bovinos, a heparina é bastante empregada para induzir a capacitação espermática, sendo sua ação notada logo no início do processo de incubação (PARRISH *et al.*, 1999). A heparina encontra-se presente no trato genital da fêmea favorecendo a interação ligante-receptor quando o SPTZ estiver em contato com as células do *cumulus oophorus*, promovendo desta forma a capacitação espermática sem induzir a reação acrossômica (O'FLAHERTY *et al.*, 1999).

Os SPTZ possuem uma membrana que é rica em ácidos graxos polinsaturados (AGPI) e que dão à sua membrana plasmática a fluidez necessária para que ele participe dos eventos de fusão de membranas que estão associados com a fecundação. Em SPTZ peroxidados existe uma diminuição de sua fluidez, diminuindo desta forma sua capacidade de fecundação (AITKEN, 1995). Além do mais, por terem seu citoplasma reduzido apresentam pouco armazenamento de GSH, ficando mais susceptíveis aos danos causados pelo estresse oxidativo (WOLF, 2005).

1.2 LESÕES CELULARES CAUSADAS PELOS RADICAIS LIVRES

Os átomos contêm um núcleo onde seus elétrons se distribuem ao redor, usualmente, em pares. É muito importante para a célula que a molécula de oxigênio (O₂) aceitando quatro elétrons, seja completamente reduzida a duas moléculas de água (H₂O). Se o O₂ é parcialmente reduzido pela recepção de somente dois elétrons, o produto desta redução será o

peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Se o O_2 receber somente um elétron, o produto será o radical superóxido (O_2^-) (VANNUCCHI *et al.*, 1998, GATE *et al.*, 1999).

O radical livre, portanto, pode ser definido como sendo um átomo ou molécula que contém um ou mais elétrons não pareados. A presença de elétrons não pareados altera a reatividade química dos átomos ou moléculas, tornando-os mais reativos que as espécies não radicalares (com elétrons pareados). As reações em cadeia dos radicais livres são então iniciadas pela remoção do (H^\cdot) de outras moléculas; superóxido (O_2^-), hidroxila, (OH^\cdot) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (JORDÃO *et al.* 1998). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o superóxido (O_2^-) são extremamente tóxicos para as células porque atacam os ácidos graxos insaturados que são componentes da bicamada lipídica da membrana, provocando lesão celular (VANNUCCHI *et al.*, 1998; GUTTERIDGE, 1999).

As células aeróbicas são protegidas do superóxido e do peróxido pela ação da superóxido dismutase (SOD), uma metaloenzima que converte o radical superóxido em peróxido de hidrogênio e pela ação da catalase que converte o peróxido de hidrogênio em água (H_2O) e oxigênio molecular (HALLIWELL *et al.*, 1999; JORDÃO *et al.*, 1998; VANNUCCHI *et al.*, 1998; POMPEU, 2005)

As espécies reativas de oxigênio (ROS) ainda podem agir de várias maneiras no organismo, promovendo a desnaturação de proteínas e/ou a peroxidação lipídica (VANNUCCHI *et al.*, 1998).

O organismo dispõe de mecanismos chamados de sistemas antioxidantes, que são capazes de prevenir os danos que estas espécies reativas de oxigênio poderiam causar no organismo. Esses mecanismos são divididos em sistemas enzimáticos compostos pela superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx); e pelo sistema não enzimático, como a vitamina E, vitamina C, carotenóides entre outros (GATE *et al.*, 1999).

O distúrbio no balanço entre pró-oxidantes e antioxidantes em favor da formação de radicais livres causa danos celulares, fenômeno este chamado de dano oxidativo ou estresse oxidativo (HALLIWELL *et al.*; 1999).

Entre as espécies reativas de oxigênio, estão, principalmente, as derivadas do oxigênio e os metais de transição. Devido à molécula de oxigênio, naturalmente ter dois elétrons não pareados, isto a qualifica como radical, portanto o oxigênio é um bom agente oxidante pela perda de elétrons. Existem diversas espécies reativas de oxigênio e no Quadro 1 estão listadas algumas delas, bem como sua meia-vida em segundos (VANNUCCHI *et al.*, 1998; JÚNIOR *et al.*, 2001).

Quadro 1: Espécies reativas de oxigênio.

Espécie Reativa de Oxigênio	
HO	Radical Hidroxilar
HO ₂	Racial Hidroperoxilar
RO	Radical Alcoxilar
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
O ₂ ⁻	Radical Superóxido
Q	Radical Semiquinona
NO	Radical Óxido Nítrico
HOCL	Ácido Hipocloroso
ONOO ⁻	Peroxinitrito

Obs.: R* é um lipídeo, por exemplo, o linoleato.

Fonte: Adaptado de VANNUCCHI *et al.*, 1998.

Quando um superóxido é gerado, há reação entre as moléculas de substâncias que participam da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, no retículo endoplasmático e outras (como as catecolaminas) com o oxigênio, em decorrência do metabolismo aeróbico (CARVALHO, 2002).

Além do oxigênio, o nitrogênio também participa da estrutura das ROS, em especial o óxido nítrico (NO). Este é sintetizado a partir da L-arginina por ação da óxido nítrico sintetase (NOS), enzima presente no endotélio e nos macrófagos. O NO promove o relaxamento do endotélio vascular (vaso-dilatação com redução da resistência periférica), inibe a agregação plaquetária, tem meia vida muito curta, em torno de milésimos de segundos, podendo rapidamente se converter em radical livre, com efeito, vaso-constritor que normalmente é anulado pela presença de vitamina C, que recupera o óxido nítrico (JÚNIOR *et al.*, 2001; CARVALHO, 2002).

No entanto, os organismos eucarióticos possuem em suas células vários sistemas de defesa ao estresse oxidativo compostos por alguns nutrientes (vitamina E, β -caroteno) e, principalmente, por antioxidantes não enzimáticos como a glutathiona (**GSH**), o ácido úrico, licopeno, bilirrubina e antioxidantes enzimáticos como a catalase (**CAT**), a glutathiona peroxidase (**GPX**) e o superóxido dismutase (**SOD**) dentre outros, conforme apresentado no Quadro 2. Estes agentes irão proteger reparar e prevenir o acúmulo de moléculas alteradas por oxidação (HSU *et al.*, 1998; GASPARRINI *et al.*, 2003; DREVET, 2006).

Quadro 2: Componentes do sistema de proteção antioxidante.

ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICOS
Glutationa (GSH)
NADPH E NADH
Vitamina C
Vitamina E
B-caroteno
PROTEÍNAS LIGADORAS DE METAIS
Albumina (Cobre)
Transferrina (Ferro)
Ferritina (Ferro)
Mioglobina (Ferro)
ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS
Superóxido Dismutase (SOD)
Catalase
Glutationa Peroxidase (GPx)

Fonte: Adaptado de VANNUCCHI *et al.*, (1998).

1.3 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E FUNÇÕES DA GLUTATIONA

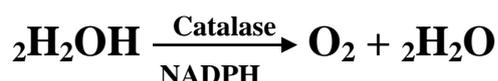
A glutaciona (GSH) é um tri-peptídeo (γ -glutamina-cisteína-glicina) não protéico presente em praticamente todas as células de mamíferos. É sintetizada a partir dos aminoácidos glutamato, cisteína e glicina. Estes aminoácidos não essenciais podem ser sintetizados no organismo e também obtidos a partir da dieta. Muitas funções da GSH se devem a suas características químicas, pois esta molécula contém um grupo tiol e um glutamato, que é resistente a degradação por peptidases (KIM *et al.*, 1999).

Seu poder redutor é utilizado para manter os grupos tiol nas proteínas intracelulares e em outras moléculas. Atua como reservatório fisiológico da cisteína e está envolvido na regulação da síntese protéica, destoxificação celular e síntese de leucotrienos (BARREIROS *et al.*, 2002).

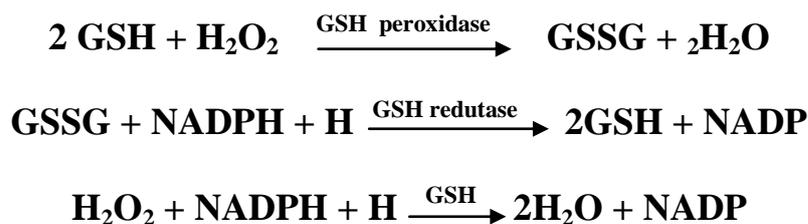
Estudos diversos sobre a evolução biológica da GSH, indicam que existe uma estreita co-relação entre GSH e o metabolismo eucariótico aeróbico; mostrando que esta molécula evoluiu para proteger as células contra a toxicidade causada pelo oxigênio (O'FLAHERTY, 1991).

São conhecidos três sistemas enzimáticos antioxidantes: o primeiro é composto por dois tipos de enzimas SOD, que catalisam a destruição do radical ânion superóxido O_2^- , convertendo-o em oxigênio e peróxido de hidrogênio. A decomposição do radical ânion superóxido O_2^- ocorre naturalmente, porém por ser uma reação de segunda ordem, necessita que ocorra colisão entre duas moléculas de O_2^- , de forma que há necessidade de maior concentração do radical ânion superóxido. A presença da enzima SOD favorece essa dismutação tornando a reação de primeira ordem, eliminando a necessidade da colisão entre as moléculas. A ação desta enzima permite a eliminação do O_2^- , mesmo em baixas concentrações. Existem duas formas de SOD no organismo, a primeira contém Cu^{2+} e Zn^{2+} , como centros redox e ocorre no citosol, sendo que sua atividade não é afetada pelo estresse oxidativo (VISCONT, *et al.*, 1995).

A segunda contém Mn^{2+} como centro redox, ocorre na mitocôndria e sua atividade aumenta com o estresse oxidativo. O segundo sistema de prevenção é muito mais simples, sendo formado pela enzima catalase que atua na dismutação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio e água (VISCONT *et al.*, 1995; KIM *et al.*, 1999; BARREIROS *et al.*, 2006). A enzima catalase irá converter o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O), conforme representado no esquema abaixo:



O sistema composto por GSH, em conjunto com as enzimas, glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR), age na presença do selênio (selênio-cisteína). Este sistema irá catalisar a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, sendo que a GSH opera em ciclos entre sua forma oxidada e reduzida. A GSH, reduz o H_2O_2 a H_2O em presença de GPx, formando ponte dissulfeto e em seguida, a GSH é regenerada, conforme representado abaixo (BARREIROS *et al.*, 2006).



Sobre as demais funções da GSH podemos citar sua participação no estoque e transporte da cisteína, regulação do balanço “redox”, metabolismo de prostaglandinas e leucotrienos, síntese de desoxirribonucleotídeos, função imune e proliferação celular. No entanto, a calatase e a GPx são os principais varredores enzimáticos de ROS, estando presentes em teores elevados nos eritrócitos e hepatócitos (VANNUCCHI *et al.*, 1998; WOLF, 2005; CARVALHO, 2006).

A enzima superóxido dismutase (SOD) previne a conversão do óxido nítrico em suas formas oxidativas, apresentando efeito sinérgico como a L-arginina (GORDON, 2003; GASPARINI *et al.*, 2002; CARVALHO, 2002).

Já *in vitro*, espécies reativas de oxigênio, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e outros radicais livres são continuamente produzidos e este aumento do estresse oxidativo é um dos principais fatores que prejudicam o desenvolvimento celular *in vitro* (MATOS *et al.*, 2002).

No oócito, por exemplo, faz-se necessário a estocagem da GSH intracelular durante a maturação, pois esta será importante para determinação da competência oocitária. No entanto supõe-se que a GSH não deve estar presente no meio de FIV, pois teoricamente inibiria o processo de fecundação em função da reação acrossômica ser dependente de estresse oxidativo. Posteriormente à fecundação, a GSH intracelular presente no gameta feminino irá auxiliar no desenvolvimento inicial do embrião, até que ele adquira capacidade de produção de suas próprias proteínas (transcrição) (O’FLAHERTY, 1999; STRADAIOLI, 2007).

O efeito das ROS nos SPTZ foi sugerido a mais de 50 anos, quando MACLEOD (1943) apud HALIWELL & GUTTERIDGE (1999), demonstrou que a exposição do SPTZ humano a altas concentrações de oxigênio resultava em toxicidade como a perda rápida da sua motilidade.

A produção excessiva de ROS nos SPTZ leva a disfunção e diminuição da capacidade de fecundação. Em condições naturais os SPTZ são expostos a um ambiente quase anaeróbico, reduzindo desta forma, os potenciais danos causados pela ROS. No entanto, quando o sêmen é manipulado para uso na fecundação *in vitro* ele é exposto ao oxigênio em

várias etapas do seu processamento podendo levar a produção de ROS, bem como a redução das defesas antioxidantes (MAIA 2003; NICHI, 2003).

No processo de PIVE, antes da união dos gametas na gota de FIV, o sêmen passa por um processo de lavagem, para serem separados do diluente, crioprotetores e plasma seminal. No entanto, este processo, retira não somente essas substâncias, como também a proteção antioxidante fornecida pelo próprio plasma seminal. Todos esses fatores podem contribuir para aumentar os danos oxidativos ao SPTZ. Estudos posteriores vieram a confirmar que os SPTZ e leucócitos presentes no sêmen são capazes de gerar ROS e que sua susceptibilidade a danos oxidativos causados pelas ROS decorrem da alta quantidade de ácidos graxos polinsaturados presentes na sua membrana plasmática (MAIA, 2003; NICHI, 2003).

Ocorre também uma grande produção de ROS por células espermáticas morfológicamente anormais e dentre essas, as que possuem resíduos de citoplasma (gotas proximal e distal). Acredita-se que a presença deste citoplasma residual aumentaria a capacidade destas células imaturas de gerar NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida), que serviria como fonte de elétrons para a produção de ROS SPTZ morfológicamente normais e imóveis, porém, funcionalmente anormais, também são fontes de ROS (AITKEN & BARKER, 2002).

Os danos causados pelos ROS na motilidade espermática se devem principalmente a uma cascata de eventos que resultam em uma diminuição na fosforilação de proteínas do axonema e a imobilização do SPTZ, ambos relacionados com uma redução na fluidez da membrana plasmática (ROMITTO, 2003).

Outro fator que provocaria a diminuição da motilidade seria a difusão do H_2O_2 na célula, através das membranas mitocondrial e/ou plasmática, inibindo a atividade da glicose 6-fosfato-desidrogenase, que controla o fluxo de glicose que, por sua vez, controla a disponibilidade de NADPH. No entanto, há mecanismos de proteção contra o estresse oxidativo no sêmen, o que compensa a deficiência de enzimas citoplasmáticas no SPTZ através de uma série de antioxidantes tais como a superóxido dismutase (SOD), o sistema glutatona peroxidase, catalase e redutase, além de existirem no plasma seminal, antioxidantes não enzimáticos, como o ascorbato, o urato, piruvato, glutatona, taurina e a hipotaurina (ALVAREZ & STOREY, 1983). Esses mecanismos de defesa segundo SALEH & AGAWAL (2002) exercem proteção através da prevenção e reparo das reações de oxidação.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito da glutathione durante o processo de separação, lavagem e capacitação espermática.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência da glutathione sobre a taxa de fecundação e polispermia;
- Avaliar a influência da glutathione sobre o desenvolvimento embrionário através das taxas de clivagem, formação de blastocisto e eclosão;
- Avaliar a influência da glutathione sobre a qualidade dos embriões produzidos *in vitro* através o número total de células.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DOS OVÁRIOS

Os ovários de vacas azebuadas (*Bos taurus indicus*) provenientes de diversos municípios do Estado do Pará foram obtidos no abatedouro frigorífico da SOCIPE (Sociedade Cooperativa dos Pecuáristas), localizado no bairro do Tapanã em Belém. Foram coletados logo após o abate, independente da idade, fase do ciclo estral, escore corporal ou estado nutricional dos animais. Os ovários foram lavados em álcool 70% e acondicionados em frasco com solução salina estéril de cloreto de sódio a 0,9% e transportados em temperatura ambiente em caixa térmica até o laboratório de Fecundação *In Vitro* do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, em um período médio de 3 horas.

3.2 RECUPERAÇÃO E SELEÇÃO DOS OÓCITOS

Folículos antrais de 2 a 8 mm foram puncionados utilizando-se agulhas 40 x 12 e seringas de 10 mL, sendo o fluido folicular obtido depositado em tubos de 15 mL. Terminada a punção, os tubos permaneceram em repouso por aproximadamente 5 a 10 minutos para decantação.

O sedimento foi transferido para uma placa de Petri estéril de poliestireno de 35 mm de diâmetro, contendo Meio 199 com tampão HEPES acrescido 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (v/v), 0,22mM de piruvato, 62,6µg/mL de penicilina, 50µg/mL de gentamicina (H-199). O rastreamento foi realizado em lupa estereomicroscópica sob um aumento de 16 x. Com o auxílio de pipeta sob fluxo laminar, os oócitos recuperados foram lavados em H-199 e selecionados para a maturação *in vitro*. Apenas os oócitos com circunferência normal,

citoplasma homogêneo, sem vacúolos ou grânulos escurecidos e que apresentem células do *cumulus oophorus* compactas e refringentes foram selecionados para a MIV.

3.3 MATURAÇÃO *IN VITRO*

Os oócitos foram lavados e incubados em meio de MIV (Meio 199 suplementado com bicarbonato de sódio, 10% SFB, 62,6µg/mL de penicilina, 50 µg/mL de gentamicina, 0,5 µg/mL de FSH, 5,0 µg/mL de LH, 0,22mM de piruvato, 10 µL/mL de insulina, transferrina e selênio (ITS) e 50 µM de β-mercaptoetanol. A incubação foi feita em placas de petri com gotas de 100 µL de meio de MIV sob óleo mineral estéril (10 a 15 oócitos por gota), em estufa de CO₂ a 5%, com 38,5°C de temperatura e atmosfera úmida, durante 22 horas (Figura 1 e 2).

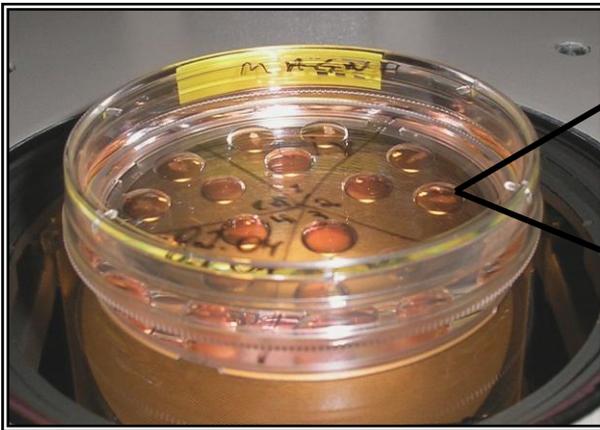


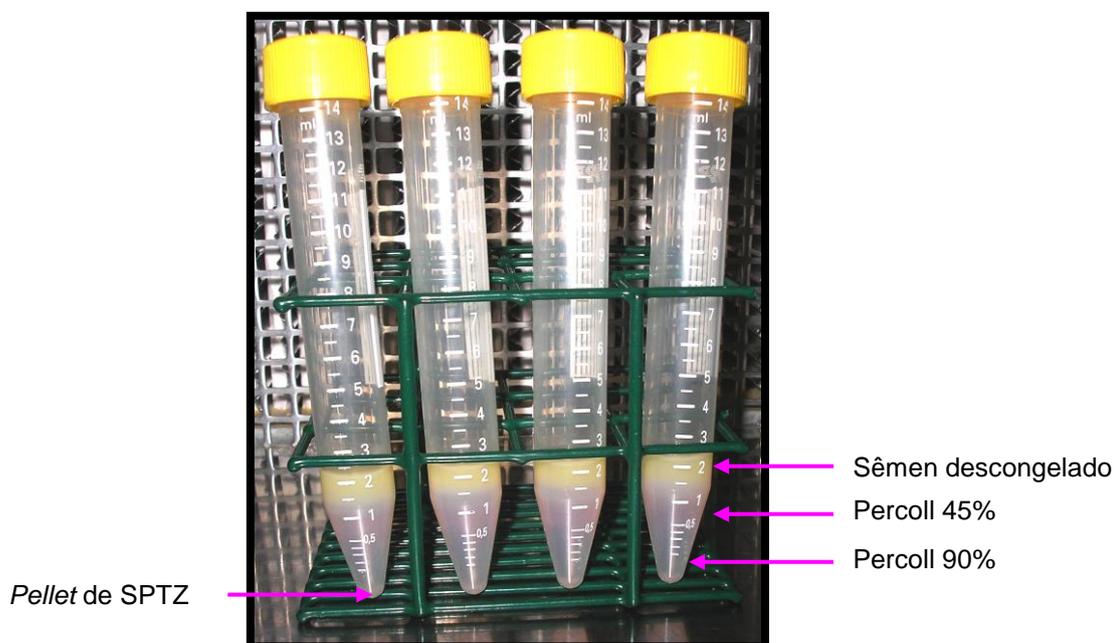
Figura 1: Placa de maturação *in vitro*.



Figura 2: Oócitos maduros.

3.4 SEPARAÇÃO E CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA

Para fecundação *in vitro* foi utilizado sêmen congelado de um único touro de origem indiana, zebu (*Bos taurus indicus*) da raça Guzerá. O método de separação dos espermatozoides dos crioprotetores e plasma seminal foi o gradiente de densidade descontínuo de Percoll. A palheta de sêmen (0,25 mL) foi aquecida em banho-maria a 35°C durante 30 segundos. O sêmen foi depositado sobre a coluna de 2 mL de Percoll (gradientes de 45 e 90%) contendo ou não 0,3mg/mL de GSH conforme os grupos experimentais e submetidos a centrifugado (200 G) por 20 minutos (Figura 3).



com gradiente descontínuo de Percoll após separação dos espermatozoides.

O sobrenadante foi desprezado e o *pellet*, foi homogeneizado em 2 mL de meio FIV com ou sem GSH e centrifugados durante 3 minutos para remoção dos resíduos de Percoll e/ou GSH de acordo com o grupo experimental. Para capacitação o pellet foi resuspendido em 2 mL de meio de FIV contendo ou não GSH e incubado por 1 hora em estufa úmida a 38,5°C e 5% CO₂.

3.5 FECUNDAÇÃO *IN VITRO*

Após os procedimentos de cada grupo experimental a concentração espermática foi ajustada para 2×10^6 SPTZ/mL e então depositados junto com os oócitos maduros em gotas de 80 μ L de meio de FIV (meio TALP, suplementado com albumina sérica bovina (BSA), heparina, penicilamina, hipotaurina, epinefrina) segundo PARRISHI *et al.*, 1999. Os gametas permaneceram co-incubados sob as mesmas condições citadas para a MIV por um período de 26 horas.

3.6 CULTIVO *IN VITRO* DOS EMBRIÕES

Para dar suporte ao desenvolvimento embrionário foi realizado um sistema de co-cultivo dos embriões bovinos sobre monocamada de células da granulosa (CG) oriundas do *cumulus oophorus* dos oócitos. O meio de MIV foi substituído por 50 μ L de meio de cultivo embrionário.

O meio de cultivo utilizado foi o Fluido Sintético do Oviduto (SOF) descrito por TERVIT *et al.* (1972), suplementado com 6 mg/mL de (BSA), glicina, 10% de SFB e antibióticos. Após 26 horas de cultivo, foram retirados 10 oócitos/zigotos de cada grupo e fixados para posterior avaliação da taxa de fecundação e polispermia. Após 20 horas, os prováveis zigotos foram submetidos à pipetagens para retirada das células do *cumulus oophorus* restantes e SPTZ aderidos à zona pelúcida e então transferidos para gotas de cultivo de acordo com cada grupo experimental, onde permaneceram incubados por nove dias.

Após 72 horas de cultivo foram acrescentados 50 μ L de meio SOF à gota de cultivo embrionário (feeding) e após 120 horas foi realizada a renovação de 50% do meio por SOF suplementado com glicose.

3.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram realizadas 5 repetições com um total de 615 oócitos distribuídos entre os grupos experimentais como descrito no Quadro 1.

Quadro 3: Distribuição dos grupos experimentais de acordo com a presença ou ausência (+ ou -) de glutatona durante os processos de separação, capacitação e lavagens dos espermatozoides.

Grupos Experimentais	Gradiente Percoll	Lavagem	Capacitação	Lavagem
Grupo Controle	-	-		-
Grupo 1	-	-	-	
Grupo 2	-	-	+	-
Grupo 3	+	+		-
Grupo 4	+	+	+	-

*Espaços em branco indicam ausência da etapa.

3.8 AVALIAÇÃO DA FECUNDAÇÃO E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

3.8.1 Fecundação e Polispermia

Após 18 horas do início da inseminação (hpi) uma amostra de oócitos/zigotos de cada grupo experimental foram retirados e fixados em etanol e ácido acético (3:1) para posterior avaliação da taxa de fecundação e polispermia. No momento da análise as amostras foram coradas com orceína acética a 1% e avaliados sob microscopia óptica com aumento de no máximo 1000 X. Foram considerados polispérmicos os que apresentaram mais de dois pró-núcleos (PN).

3.8.2 Desenvolvimento Embrionário

A clivagem foi avaliada 72 horas após a FIV, onde foram considerados clivados os embriões que apresentavam duas ou mais células, sem sinais de fragmentação ou degeneração celular. As taxas de blastocisto e blastocistos eclodidos foram obtidas no 7º e 9º dia de cultivo, respectivamente.

3.8.3 Avaliação da Qualidade Embrionária

No sétimo dia de cultivo embrionário, foi analisada uma amostra de cada grupo para verificar a qualidade embrionária através da contagem do número de núcleos presentes em cada embrião (números de células).

Os embriões foram fixados em formol salino tamponado e posteriormente corados durante 5 minutos e sob proteção de luz, com corante fluorescente Hoescht 33342 (1µg/mL) diluído em H-199. Os embriões corados foram montados (2-3 blastocistos) entre lâmina e lamínula e em seguida visualizados em microscópio invertido de fluorescência.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As taxas de formação pro nuclear, clivagem e desenvolvimento embrionário, obtidas nos diferentes tratamentos foram comparadas entre si e com o grupo controle, através do teste de qui-quadrado (χ^2), e da qualidade embrionária pelo teste ANOVA com o auxílio do programa Bio Estat 3.0 (AIRES *et al.*, 2003) com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 FECUNDAÇÃO E POLISPERMIA

A análise das taxas de fecundação (Figura 4) monospérmica e polispérmica do Grupo Controle (64 e 5,9%, respectivamente) não mostrou diferença ($p>0,05$) com relação ao Grupo 1 (65,2 e 6,3%), Grupo 2 (55,2 e 18,2%), Grupo 3 (43,3 e 23,5%) e Grupo 4 (61,3 e 13,6%) e nem destes entre si com relação aos diferentes tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1: Taxa de fecundação monospérmica e polispérmica

Grupos Experimentais	n	Fecundação	
		Monospérmica (%)	Polispérmica (%*)
Grupo Controle	25	16 (64)	1(5,9)
Grupo 1	23	15 (65,2)	1(6,25)
Grupo 2	29	18 (55,2)	4(18)
Grupo 3	30	13 (43,3)	4 (23,5)
Grupo 4	31	19 (61,3)	3 (13,6)

n=número amostral; * taxa de polispermia a partir do número total de fecundados.

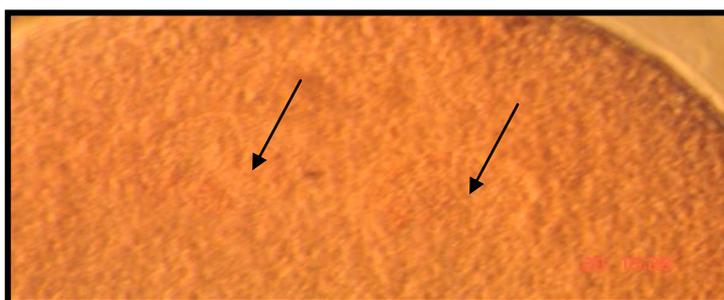


Figura 4: Fotomicrografia de um zigoto fixado com 18h hpi mostrando dois pró-núcleos.

5.2 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

A avaliação do desenvolvimento embrionário não mostrou diferença ($p>0,05$) com relação às taxas de clivagem (Figura 5), blastocisto (Figura 6) e eclosão entre o Grupo Controle (52, 35 e 50%, respectivamente) e os Grupo 1 (60, 37 e 44%), Grupo 2 (57, 40 e 50%), Grupo 3 (56, 37 e 51%), Grupo 4 (47, 30 e 48%) e nem destes entre si (Tabela 2).

Tabela 2: Taxas de desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Grupos	n	Clivagem (%)	Blastocisto (%)	Eclosão (%)
Grupo Controle	98	51 (52)	34 (35)	17 (50)
Grupo 1	98	59 (60)	36 (37)	16 (44)
Grupo 2	86	49 (57)	34 (40)	17 (50)
Grupo 3	100	56 (56)	37 (37)	19 (51)
Grupo 4	95	45 (47)	29 (30)	14 (48)

n=número amostral.

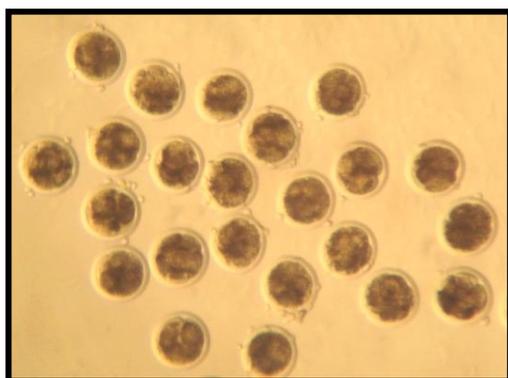


Figura 5: Foto micrografia de clivagem (Grupo Controle).



Figura 6: Foto micrografia de blastocistos D7 (Grupo Controle).

5.3 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE EMBRIONÁRIA

Com relação à quantificação do número total de células dos embriões produzidos nos diferentes tratamentos não houve diferença ($p>0,05$) entre os Grupo 1 (58 ± 18), Grupo 2 (66 ± 20), Grupo 3 (62 ± 22) e Grupo 4 (77 ± 29) com relação ao Grupo Controle (31 ± 22) (Tabela 3).

Tabela 3: Número total de células dos blastocistos no sétimo dia de desenvolvimento.

GRUPOS	n	Média (\pm DP)
Grupo Controle	9	30,9 (\pm 21,87)
Grupo 1	11	57,8 (\pm 18,26)
Grupo 2	6	66,2 (\pm 20,14)
Grupo 3	8	62,1 (\pm 22,48)
Grupo 4	9	76,7 (\pm 29,28)

n= Número amostral.

6 DISCUSSÃO

A proposta deste trabalho visou melhorar a PIVE através da utilização de uma substância que oferece proteção antioxidante ao SPTZ, pois segundo MAIA *apud* AITKEN & CLARKON (1987) a rápida perda de motilidade e alterações a nível de DNA podem estar relacionadas à altas concentrações de ROS produzidas, principalmente, pelos leucócitos do ejaculado e pelos próprios SPTZ.

A primeira indicação de que o estresse oxidativo poderia afetar a viabilidade e função dos SPTZ, foi em 1943, quando MACLEOD observou que o SPTZ humano perdia rapidamente sua motilidade quando incubados em elevadas concentrações de ânion superóxido (O_2^-) e que a adição da catalase oferecia algum tipo de proteção a essas células.

A influência da GSH quando adicionada ao meio de lavagem espermática e FIV foi relatada em bovinos e porcos. Embora sua adição ao meio de fecundação não tenha influenciado as taxas de clivagem e qualidade embrionária foi observada melhora na formação de blastocistos (EARL *et al.*, 1997; BOQUEST *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 1999; WOLF, 2005).

BOQUEST *et al.* (1999) utilizou a GSH (0; 125; 1,25 ou 1,5 mM) durante a lavagem espermática e a fecundação em suínos e não obteve diferença ($p > 0,05$) com relação as taxas de fecundação, polispermia e clivagem. Entretanto, houve um incremento na formação de blastocisto nas concentrações de 0,125 mM (36%) e 0,25 mM (34%) quando comparada ao controle 0mM (19%).

Neste trabalho, o emprego da GSH (1mM) no processo de lavagem e capacitação espermática por um período de um hora, não apresentou diferença nas taxas de clivagem, blastocisto, eclosão entre os **Grupos Controle** (52, 35, 50%), **G1** (60, 37, 44%), **G2** (57, 40, 50%), **G3** (56, 37, 51%), **G4** (47, 30, 48%).

KIM *et al.* (1999), testou o efeito da GSH exógena (1mM) no meio de fecundação *in vitro* usando diferentes touros **A**, **B**, **C** e **D**. Segundo este autor ficou claro que a influência desta substância em relação à formação de blastocisto é touro dependente, pois quando avaliou o touro **B** e **D** observou um declive na taxa de embriões, já o touro **C** apresentou um aumento na produção de embriões em comparação com o **Controle** (27,3 a 20,1%, respectivamente). O touro **A** não mostrou diferença significativa.

O fato de termos utilizado somente um touro pode ter influenciado a não ter havido diferenças entre as taxas de fecundação e desenvolvimento embrionário.

A possibilidade de o tratamento favorecer alguns touros pode trazer benefícios ao produtor e as centrais de PIVE, principalmente, quando aplicada em animais de alto valor zootécnico e que apresentam baixa produção de embriões *in vitro*. Sendo necessário, portanto, mais experimentos com diferentes touros, raças e concentrações da GSH.

7 CONCLUSÕES

Não houve diferença significativa com relação às taxas de fecundação monospermica e polispermica entre o Grupo Controle e os demais grupos experimentais e nem destes entre si após o tratamento dos espermatozoides com glutathione;

Não houve influência da glutathione nas taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário.

A avaliação qualitativa dos embriões no sétimo dia de desenvolvimento não mostrou diferença com relação ao número total de células entre o Grupo Controle e os demais Grupos experimentais.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES, M.M. **Fisiologia**. Guanabara Koogan. 2^a ed. Rio de Janeiro, 2003.

AITKEN, R. J. & BARKER, M. A. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma. **International Journal of Andrology**. V. 25, p. 191-194, 2002.

AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reprod. Fertil. Devel.**, v 7, p. 659-668, 1995.

ALI, A.A., BILODEAU, J.F. AND SIRARD M.A. Antioxidante requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. Department of animal science, Centre de Recherche en Biologia de la Reproduction (CRBR), Laval University, Quebec, Canada G1K 7P4. **Theriogenology**, Volume 59, Issues 3-4, February 2003, p. 939-949

ALVARENGA, M.A. Editorial, **O Embrião**: Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Jaboticabal,; Editorial, n.22,p.1,2005.

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

ASSUMPTIÇÃO, M. E.; HAIPECK, O. D.; LIMA, K. A. Capacitação espermática in vitro com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, vol.39, n.3, p.149-156. ISSN 1413-9596, 2002.

AUSTIN, C.R. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. **Australian Journal of Science Research**, v.4, n.1, p.581-596, 1951.

AYRES, M.; AYRES, M. Jr.; AYRES, D.L. AND SANTOS, A.S.: **BIOESTAT 3.0** aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 2003.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J M.; e DAVID, J P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, jan./fev. 2006, vol.29, nº.1, p.113-123. ISSN 0100-4042.

BLANDAU, R.J. *In Vitro* fertilization and embryo transfer. **Fertility and Sterility**, v.33, p3-11, 1980.

BOQUEST, A.C.; ABEYDEERA, L.R.; WANG, W.H.; AND DAY, B.N. Effect of adding reduced glutathione during insemination on the development of porcine embryos *in vitro*. **Theriogenology**, Volume 51, Issue 7, May 1999, p. 1311-1319.

BRACKETT, B.G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M.L.; DONAWICK, W.J.; EVANS, J.F.; DRESSEL, M.A. Normal development following in vitro fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v. 27, n. 1, p. 147-158, 1982.

CARVALHO, O. F.; FERREIRA, J. D. J.; SILVEIRA, N. A. Oxidative effect of nitric oxide and male infertility. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, vol.38, no.1, p.33-38. ISSN 1676-2444, Jan. 2002.

CHANG, M.C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in to the fallopian tube. **Nature**, v.168, n.1, p.697-698, 1951.

DREVET, J. R. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: A complete story. **Elsevier. Molecular and Cellular Endocrinology**. 2006.

EARL C.R., J. KELLY, J. ROWE, D.T. AMSTRONG. Glutathione treatment of bovine sperm enhances in vitro blastocyst production rates. **Theriogenology**. Volume 47, Issue 1, January 1997, p. 255

FERRARI, S. Meios de Capacitação espermática na espécie ovina (*Ovis áries*, Linnaeus, 1758): reação acrossômica e penetração *in vitro* em oócitos zona-free de hamster. **Tese** (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, p71 Universidade de São Paulo, 1997.

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

GABALDI, S. H.; WOLF, A.; ESPER, C.R. Os eventos da fertilização em mamíferos. **Ciê. Agr. Saúde**. FEA, Andradina, v.2, n.2, p 61-65, jul-dez, 2002.

GASPARRINI, B.; SAYOUD, H.; NEGLIA, G.; MATOS, D. G.; DONNAY, I.; ZICARELLI, L. Glutathione synthesis during in vitro maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effects of cysteamine on embryo development, **Theriogenology**, 2003.

GATE, L; PAUL, J; BA GN; TEW, KD, TAPIERO, H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. **Biomed Pharmacother** 1999; 53 (4): 169-80.

GONÇALVES, P. B. D; VISINTIN, J. A; OLIVEIRA, M. A. L; MONTAGNER, M. M. AND COSTA, L. F. S. Produção *in vitro* de embriões. In: **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 1ª ed., São Paulo: Gonçalves, P. B. D; Figueiredo, J. R. & Freitas, V. J. F., 2002. p. 195- 196.

HAFEZ, E. S. E.; **Reprodução animal**. 6ª ed. Ed. Manole, p. 174-175, São Paulo 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, JMC. **Free radical in biology and medicine**. 3ed., Oxford Science Press: New Work, p936, 1999.

HOGAN, B.; CONSTANTINI, F.; LACY, E. Developmental genetics and embryology of the mouse: past, present, and future. Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, p.12-14. 1986

HSU, P.C. LIU, M.Y. HSU, C.C. et al. Effects of vitamin E and/or C on reactive oxygen species-related lead toxicity in rat sperm. **Toxicology**, s. L., v. 128, p. 169-179, 1998.

HUNTER, LHF, H. Sperm transport in cows: Peri-ovulatory redistribution of viable cells within the oviduct. **Reprod. Nutr. Develop.** 24 (5A): 597-608, 1984.

JORDÃO Jr AA., CHIARELLO, G.P., BERNARDES, M.S.M., VANNUCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutathione reduzida e da vitamina E. **Medicina**, Ribeirão Preto, 31: 434-449, jul./set. 1998.

JUNIOR, L. R.; Hoehr, N. F.; Vellasco, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathione associado a métodos eletrônicos na avaliação do estresse oxidativo. **Quim. Nova**, Vol. 24, Nº 1, 112-119, 2001.

KIM, I.H.; VAN LANGENDONCKT, A.; VAN SOOM, A.; VANROOSE, G.; CASI, A. L.; HENDRIKSEN, P.J.M.; BEVERS, M. M. Effect of exogenous glutathione on *in vitro* fertilization of bovine oocytes. **Theriogenology** 52:537-547,1999.

LIU, Z.; FOOT, R.H. Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O₂. **Biol Reprod** 1995;2:53:786-90.

MAIA, M. S. Espécies reativas do metabolismo do oxigênio, antioxidantes e função espermática. **Monografia** apresentada à disciplina Seminários de Reprodução I do programa de pós-graduação em medicina veterinária em reprodução animal da faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp. Botucatu, 2003.

MASTROIANNI, Jr.; JONES, R. Oxygen tensions in the rabbit fallopian tube. **J Reprod. Fertil**, 1965;9:99-102.

MATOS, D. G; FURNUS, C. C.; MOSES, D. F. Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. **Biology of Reproduction**. v. 52, p. 1420-1425, 1997.

MATOS, D. G; GASPARRINI, G.; PASQUALINI, S. R.; THOMPSON, J.G.: Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content on embryo development and intracellular peroxide content. **Theriogenology**, 57: 1443 – 1451, 2002.

NASR-ESFAHANI, M.H.; AITKEN, Jr, JOHNSON, M.H. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed in vitro or *in vivo*. **Development** 1990; 109:501-507.

NICHI, M. Sistemas de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídios seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados, MS. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo; p. 101, 003.

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

O'FLAHERTY, R. C.; SUNDQUIST, A. R. Evolution of glutathione metabolism. **Adv. Enzymol Relat. Áreas mol. Biolog.** 64: 1-53, 1991.

PALMA, G. A. & BREM, G.: **Transferencia de Embriones y Biotecnología de la Reproducción en la Especie Bovina**. Editora Hemisferio Sur, p. 243-266, 1993.

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

POMPEU, G.B. Análise da resposta antioxidativa de células *in vitro* de fumo (*Nicotiana tabacum* cv BY-2) submetidas ao metal pesado níquel. **Dissertação** apresentada para obtenção do título de Mestre em Ecologia de Agroecossistemas. Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, 2005.

RODRIGUES, J. L.; Palavra do Presidente da Sociedade Brasileira de Transferência de Embrião. **Arquivos da Faculdade de Veterinária de UFRGS**, 25(1): 4-7, 1999.

ROMITTO, C. G. Perfil bidimensional de proteínas do plasma seminal e características ligadas ao desempenho reprodutivo de touros de corte. **Trabalho de Dissertação** do Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2003.

SALEH, R. A.; AGARWAL, A. Oxidative stress and male infertility: From research bench to clinical practice. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 6, p.737-752, 2002.

SOUZA, D. B. Eventos envolvidos no processo de capacitação *in vivo*. **Monografia** do programa de Pós-graduação (Doutorado) Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia Universidade Estadual Paulista. Botucatu. São Paulo, 2003.

STEPTOE, P.C. & EDWARDS, R.G. Birth after the preimplantation of a human embryo. **Lancet**, v.2, p. 336, 1978.

STRADAIOLI, G. T. NORO, L. SYLLA, M. MONACI. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation : Comparison between two extenders. **Theriogenology**, Volume 67, issue 7^o15 April 2007, Pages 1249-1255.

TERVIT, H. R. WHITTINGHAM, D.G. AND ROWSON, L.E.: Successful culture in vitro of the sheep and cattle ova. **Jornal Reproduction and Fertility**, 30: 493-497, 1972.

VANNUCCHI, H; MOREIRA, A. AM.; CUNHA, D. F.; FRANCO, M. V. M. J.; BERNARDES, M. M.; JORDÃO, *et al.*, J. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. **Medicina, Ribeirão Preto**, 31: 31-44, janeiro a março, 1998.

VISCONTI, P. E., BAILEY, J. L., MOORE, G.D., PAN, D., OLDS-CLARKE, P. Capacitation of mouse spermatozoa. **Development**, v. 121, p. 1129-1137, 1995.

VAN DE VELDE, H.; DE VOS, A.; SEMON, K.; RYCKES, S. M. C.; LISSENS, W.; VANDERYORST, M.; RANST, H. V.; LIABAERS, I.; STEIRTEHGHEM, A. V. Embryo implantaio affter biopsy o fone or two cells from cleavage-stage embryos with a view to preimplantation genetic diagnosis. **Prenatal Diagnosis**. Vol. 20, Issue 13, p 1030 – 1037, 2000.

VITROGEN, 2004: Biotecnologias da Reprodução Bovina. Resultados Obtidos de Novembro de 2002 a Maio de 2004. Disponível em: http://www.vitrogenbr.com/index_ok.asp/. Acessado em 03/09/2004.

WOLF, A. Estímulo da síntese de glutatona na maturação in vitro de oócitos bovinos e sua influência no desenvolvimento embrionário. **Trabalho de dissertação**. Botucatu, 2005.