

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLEO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DESENVOLVIMENTO RURAL  
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA -  
AMAZÔNIA ORIENTAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**THIAGO VELASCO GUIMARÃES SILVA**

**USO DA L-ARGININA NOS PROCESSOS DE  
CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA E FECUNDAÇÃO *IN VITRO*  
DE OÓCITOS BOVINOS**

**Belém  
2010**

**THIAGO VELASCO GUIMARÃES SILVA**

**USO DA L-ARGININA NOS PROCESSOS DE  
CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA E FECUNDAÇÃO *IN VITRO*  
DE OÓCITOS BOVINOS**

Trabalho de dissertação apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.

Área de concentração: Produção Animal.  
Orientador Prof. Dr. Otávio Mitio Ohashi.

**Belém  
2010**

**THIAGO VELASCO GUIMARÃES SILVA**

**USO DA L-ARGININA NOS PROCESSOS DE  
CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA E FECUNDAÇÃO *IN VITRO*  
DE OÓCITOS BOVINOS**

Trabalho de dissertação apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.

Área de concentração: Produção Animal.

Data da aprovação. Belém - PA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Banca Examinadora

---

Prof. Dr. Otávio Mitio Ohashi (**Orientador**)  
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

---

Prof. Dr. Paulo Roberto Adona  
Universidade Norte do Paraná – UNOPAR

---

Prof. Dr. Moysés dos Santos Miranda  
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

## **DEDICATÓRIA**

**A Deus, por me presentear com a vida, com as oportunidades que tive até hoje e com as pessoas abaixo mencionadas.**

**Aos meus pais, minha avó e minha irmã, pelo total apoio, carinho e compreensão que recebi nos momentos difíceis. Vocês que não medem esforços para sermos uma família unida e feliz em Deus, muito obrigado!**

**À minha namorada, mulher da minha vida e futura esposa, se Deus assim permitir, pelo carinho, amor e atenção que tem por mim, e pelo incansável companheirismo em cada momento dessa jornada.**

**Aos verdadeiros amigos, que sempre confiaram em meu potencial e me incentivaram.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, o mais importante nesta caminhada;

Aos meus pais, avós, irmã, namorada e padrinhos que sempre me incentivaram a ter forças para continuar e pelo amor e carinho sempre;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Otávio Mitio Ohashi, por ter me dado a oportunidade de estar na sua equipe de trabalho, pelo apoio e paciência durante este período;

Aos meus amigos do Laboratório de Fecundação *in Vitro* da UFPA (professor Ohashi, Simone, Moysés, Marcela, Rafael, Nathália, "Mohamed", Priscila, Davi, "Chamusca", Juliana e Ellen) que não mediram esforços para me ajudar e pelo agradável convívio;

Ao Laboratório de Parasitologia da UFPA, em especial a Eliane, pelo auxílio com a técnica de dosagem de Nitrato/Nitrito;

A minha cunhada, Juliana, pelo auxílio nas análises estatísticas e pelos incentivos;

Aos demais amigos pelo apoio do dia-a-dia;

A esta gestão da Universidade Federal do Pará que, em meio a tantas dificuldades, oportunizou a sociedade a formação de profissionais capacitados técnica e socialmente;

Ao CNPq pelo apoio financeiro;

À Universidade Norte do Paraná - UNOPAR;

Ao Matadouro Frigorífico do Tapanã e a SOCIPE, pela doação do material biológico, indispensável para realização deste trabalho, e aos seus funcionários pelo auxílio técnico.

## **CERTEZA**

“De tudo, ficaram três coisas:

A certeza de que ele estava sempre começando...

A certeza de que era preciso continuar...

A certeza de que seria interrompido antes de terminar....

Fazer da interrupção um caminho novo...

Fazer da queda um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro...”

***Fernando Sabino***

“Pois será como a árvore plantada junto a ribeiros de águas, a qual dá o seu fruto no seu tempo; as suas folhas não cairão, e tudo quanto fizer prosperará.”

***(Salmos 1 : 3)***

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso da L-arginina nos processos de capacitação espermática e fecundação *in vitro* (FIV), analisando sua influência no desenvolvimento embrionário, utilizando o sêmen de dois touros (*Bos taurus* e *Bos indicus*). No experimento 1, os espermatozóides foram incubados, sem a presença de oócitos, durante 0, 1, 2 e 3 h em meio de FIV adicionado de 0, 1, 10 e 50 mM de L-arginina, sendo analisada a taxa de reação acrossômica. No experimento 2, espermatozóides e oócitos foram incubados em meio de FIV acrescido com as concentrações de L-arginina citadas anteriormente, durante aproximadamente 30 h. Os oócitos bovinos foram maturados *in vitro* (MIV) e o subsequente cultivo embrionário (CIV) foi realizado sobre monocamada de células da granulosa, em meio SOF, sendo avaliadas as taxas de fecundação (18 hpi), clivagem e blastocisto (2<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> dia de cultivo, respectivamente). A dosagem de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup> produzido durante a FIV foi realizada através do método colorimétrico de Griess. Para análise estatística dos dados, foi utilizado a ANOVA, com nível de significância de 5%. A L-arginina (1 mM), quando adicionada ao meio de capacitação espermática, durante duas horas, aumentou a taxa de reação acrossômica em relação ao controle (31,1±2,78 vs 23,4±2,65) em *Bos taurus*. A adição de L-arginina (50 mM) ao meio de FIV (experimento 2), tanto em *Bos taurus* quanto em *Bos indicus*, diminuiu as taxas de clivagem (78,7±2,17 vs 65,7±9,32; 72,7±3,36 vs 45±7,12; respectivamente) e blastocisto (39,4±3,78 vs 15,2±6,12; 39,4±4,39 vs 16±8,54; respectivamente) em relação ao controle. Sendo assim, observou-se que a L-arginina aumentou a taxa de reação acrossômica em *Bos taurus*, porém reduziu as taxas de clivagem e blastocistos em ambos os touros, sem influenciar na qualidade do embrião.

**Palavras-chave:** L-arginina, óxido nítrico, fecundação *in vitro*.

## ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the use of the L-arginine in sperm capacitation and *in vitro* fertilization (IVF), analyzing its influence on the embryonic development, using semen from two bulls (*Bos taurus* and *Bos indicus*). In experiment 1, the spermatozoa had been incubated without oocytes, during 0, 1, 2 and 3 hour in IVF medium added of 0, 1, 10 and 50 mM L-arginine. In experiment 2, spermatozoa and oocytes had been incubated in IVF medium added with the L-arginine concentrations previously cited, during approximately 30 hour. The bovine oocytes had been matured *in vitro* (IVM) and embryonic culture (IVC) was supported by a monolayer of granulosa cells in SOF medium. It was evaluated fertilization (18 hpi), cleavage and blastocyst rates (2<sup>o</sup> and 7<sup>o</sup> culture day, respectively). The Griess colorimetric method was applied to mensurement of the NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup> produced during the IVF. For statistics analysis, values were considered significantly different if P<0.05 following the ANOVA test. The results had shown that L-arginine (1 mM), when added during sperm capacitation for two hours, increased the acrosome reaction rate as compared to *Bos taurus* control group (31,1±2,78 versus 23,4±2,65). The addition of L-arginine (50 mM) to IVF medium (experiment 2), in both *Bos taurus* and *Bos indicus* spermatozoa, decreased cleavage rate (78,7±2,17 versus 65,7±9,32; 72,7±3,36 versus 45±7,12; respectively) and blastocyst rate (39,4±3,78 versus 15,2±6,12; 39,4±4,39 versus 16±8,54; respectively) as compared to control group. These results provide that L-arginine increased the acrosome reaction rate in *Bos taurus*, however reduced the cleavage and blastocyst rates in both the bulls, but had not influenced the embryo quality.

**Key-words:** L-arginine, nitric oxide, *in vitro* fertilization.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01:</b>	Estrutura organizacional de um espermatozóide de bovino.....	21
<b>Figura 02:</b>	Seqüência de eventos durante a reação acrossômica em espermatozoides de bovinos.....	22
<b>Figura 03:</b>	Biossíntese do óxido nítrico a partir de L-arginina. Requerimento de um grande número de co-fatores.....	25
<b>Figura 04:</b>	Biossíntese do óxido nítrico a partir de L-arginina, a formação da citrulina e sua reciclagem para L-arginina.....	26
<b>Figura 05:</b>	Fotomicrografia mostrando espermatozoides reação acrossômica negativa e reação acrossômica positiva.....	29
<b>Figura 06:</b>	Fotografia mostrando as etapas de aspiração folicular (A), seleção (B) do complexo <i>cumulus</i> -oócito de qualidade 1 e 2, (C) sob estereomicroscópio e (D) maturação <i>in vitro</i> em estufa com 38,5°C e alta umidade.....	31
<b>Figura 07:</b>	Sêmen sobre gradiente de densidade descontínuo de Percoll.....	32
<b>Figura 08:</b>	Gráfico ilustrando as concentrações de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> produzidas no meio de FIV utilizando as diferentes concentrações de L-arginina e o sêmen de <i>Bos indicus</i> e <i>Bos taurus</i> .....	38

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01:</b> Apresentação das médias e desvio padrão ( $\pm$ ) de reação acrossômica de quatro replicações representativas do efeito da L-arginina sob diferentes concentrações e diferentes tempos durante a capacitação espermática <i>in vitro</i> , utilizando o sêmen de um touro <i>Bos taurus</i> e de um touro <i>Bos indicus</i> .....	37
<b>Tabela 02:</b> Taxas de oócitos bovinos fecundados, polispérmicos e não fecundados <i>in vitro</i> nos diferentes grupos experimentais.....	39
<b>Tabela 03:</b> Taxas de clivagem e blastocisto dos embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> nos diferentes grupos experimentais.....	40
<b>Tabela 04:</b> Cinética do desenvolvimento no sétimo dia de cultivo.....	42
<b>Tabela 05:</b> Avaliação qualitativa dos embriões fixados no sétimo dia de cultivo..	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
ANOVA	Análise de Variância
ANUALPEC	Anuário Estatístico da Pecuária de Corte
ATP	Adenosina Tri-fosfato
BH <sub>4</sub>	Tetrahidrobiopterina
BSA	Albumina Sérica Bovina
Ca <sup>+2</sup>	Cálcio
CO <sub>2</sub>	Gás Carbônico
COC	<i>Complexo-cumulus-oócitos</i>
ERON	Espécies Reativas do Oxigênio e Nitrogênio
et al.	<i>et alli</i> (e colaboradores)
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FMN	Flavina Mononucleotídeo
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
G	Gravidade
GMPc	Guanosina Monofosfato Cíclico
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bicarbonato de sódio
IFN-γ	Interferon gama
LH	Hormônio Luteinizante
L-NAME	Nitro-L-Arginina Metil Éster
L-NMMA	Monometil-L-Arginina
L-NNA	Nitro-L-Arginina
MIV	Maturação <i>in vitro</i>

NaCl	Cloreto de sódio
NADP <sup>+</sup>	Forma Oxidada de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfatada
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfatada
NO	Óxido Nítrico
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrito
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrato
Nos	Óxido Nítrico Sintetase
O <sub>2</sub>	Oxigênio
PBS	Phosphate Buffer Saline
Ph	Potencial Hidrogeniônico
PIP	Fosfatidilinositol bifosfato
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embrião
q.s.p.	Quantidade suficiente para
SFB	Soro Fetal Bovino
SNP	Nitroprussiato de sódio
SOF	Sintetic Oviduct Fluid
TCM-199	Tissue Culture Medium 199
TL	TALP (Tyrodes com Albumina, Lactato e Piruvato)
TNF- $\gamma$	Fator de necrose tumoral gama
UI	Unidade internacional
ZP1	Proteína da zona pelúcida 1
ZP2	Proteína da zona pelúcida 2
ZP3	Proteína da zona pelúcida 3

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1 OBJETIVOS .....	16
<b>1.1.1 Objetivo Geral</b> .....	16
<b>1.1.2. Objetivos Específicos</b> .....	16
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
2.1 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES (PIVE) .....	17
2.2 FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i> (FIV) .....	18
2.3 CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA E REAÇÃO ACROSSÔMICA .....	20
2.4 ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO E NITROGÊNIO .....	22
2.5 L-ARGININA .....	23
2.6 ÓXIDO NÍTRICO .....	26
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	29
3.1 AVALIAÇÃO DA CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA .....	29
3.2 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES .....	30
<b>3.2.1 Coleta de Ovários e Punção Folicular</b> .....	30
<b>3.2.2 Rastreamento e Seleção dos Complexos-<i>Cumulus</i>-Oócito (COC)</b> .....	30
<b>3.2.3 Maturação <i>In Vitro</i> (MIV)</b> .....	30
<b>3.2.4 Fecundação <i>In Vitro</i> (FIV)</b> .....	31
<b>3.2.5 Dosagem de Nitrato/Nitrito (No<sub>3</sub><sup>-</sup>/No<sub>2</sub><sup>-</sup>)</b> .....	32
<b>3.2.6 Cultivo <i>In Vitro</i> (CIV)</b> .....	33
3.3 ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO .....	33
<b>3.3.1 Análise Quantitativa</b> .....	33
<b>3.3.2 Análise Qualitativa</b> .....	34

3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	34
<b>3.4.1 Experimento 1:</b> Ação da L-arginina no processo de reação acrossômica.....	34
<b>3.4.2 Experimento 2:</b> Efeito da L-arginina durante o processo de capacitação espermática na produção <i>in vitro</i> de embriões.....	34
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	35
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>47</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo apresentando 19% da população bovina mundial com mais de 160 milhões de cabeças (ANUALPEC, 2007). É o segundo maior produtor e exportador de carne bovina, abatendo cerca de 45 milhões de cabeças e exportando 2,42 milhões de toneladas, ultrapassando países do primeiro mundo como Estados Unidos e Austrália ficando atrás somente da Índia (TAMASSIA, 2007).

Neste cenário, todas as fases do sistema produtivo de bovinos de corte, relacionados à rentabilidade da pecuária, ganharam importância, destacando-se entre elas o manejo produtivo do rebanho, por interferir diretamente nos aspectos quantitativos e qualitativos dos bezerros produzidos. Fundamentando e, cada vez mais, impulsionando a produtividade está a implementação e o desenvolvimento de diversas práticas visando o melhoramento do rebanho bovino nacional como as biotecnologias reprodutivas (TAMASSIA, 2007).

Entre as biotecnologias reprodutivas a Produção *In Vitro* de Embriões (PIVE) é cada vez mais difundida e utilizada comercialmente em vários países (PALMA & BREM, 1993; SAUVÉ, 1998), inclusive de forma destacada e com resultados bastante promissores no Brasil, a partir da década de 90 (RODRIGUES, 1997).

Os dados referentes a produção e transferência de embriões bovinos no mundo em 2007, confirmaram tendência de aumento na participação do Brasil no mercado mundial (32,8% do total mundial), sendo que, no mercado de embriões FIV, o país consolidou uma liderança absoluta respondendo por mais de 85% do total mundial (VIANA, 2009).

Vários estudos permitiram o melhor entendimento dos fenômenos de capacitação espermática, crescimento, maturação, fecundação, bem como do desenvolvimento embrionário e de seus mecanismos de regulação (GONÇALVES et al., 2002). Com isso, muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos a fim de melhorar as condições de maturação *in vitro* do gameta feminino (WOLF, 2005). Entretanto, há necessidade de mais pesquisas voltadas ao gameta masculino, principalmente relacionadas ao processo de capacitação espermática *in vitro* (YANAGIMACHI, 1994).

Nesse contexto, vários elementos têm sido utilizados em busca da melhoria do processo de capacitação espermática *in vitro*, através da utilização de substâncias como geldanamicina, osteopontina e L-arginina (O'FLAHERTY et al., 2004; HOU et al., 2008; MONACO et al., 2008; ROY & ATREJA, 2008). A L-arginina desempenha importante função na motilidade espermática, além de induzir a capacitação e reação acrossômica em várias espécies de mamíferos, inclusive em bovinos. Tais efeitos têm sido relacionados com o óxido nítrico (NO), uma vez que a L-arginina serve de substrato para a enzima óxido nítrico sintase (NOs) na produção do NO (O'FLAHERTY et al., 2004).

A identificação do NO como sinalizador intra e intercelular aumentou o número de pesquisas nesta área e este interesse se deve ao fato da síntese de NO ser observada em uma grande variedade de tipos celulares, inclusive nos relacionados com a reprodução (MARLETTA, 1993; HERRERO et al., 1994; O'BRYAN et al., 1998; LEAL et al., 2009).

Entretanto, a maioria dos trabalhos com L-arginina na capacitação espermática, em mamíferos, não extrapolam seu efeito a processos posteriores, como a fecundação *in vitro* (FIV), tornando-se necessário avaliar o efeito da L-arginina, durante a capacitação espermática e FIV na produção *in vitro* de embriões.

Dessa forma, a hipótese deste trabalho é a de que a L-arginina, adicionada ao meio de FIV, influenciará em tal processo melhorando a fecundação e conseqüentemente o desenvolvimento embrionário.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

- Avaliar a influência da L-arginina durante a fecundação *in vitro* na produção *in vitro* de embriões bovinos.

### 1.1.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a influência da L-arginina na capacitação espermática *in vitro* através da análise da taxa de reação acrossômica;

- Avaliar a produção de óxido nítrico durante a FIV através da dosagem de nitrato/nitrito ( $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ ) no meio de FIV;

- Avaliar a influência do uso da L-arginina na FIV no subsequente desenvolvimento embrionário através da análise quantitativa (taxas de fecundação, clivagem e formação de blastocisto) e qualitativa (cinética do desenvolvimento embrionário e do número total de células).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (PIVE)

O primeiro relato sobre a possibilidade de se produzir embriões de mamífero *in vitro* surgiu na década de 20. Entretanto, somente na década de 50 é que foi registrado o nascimento do primeiro mamífero (coelho) gerado a partir da FIV, sendo que, apenas no início da década de 80, constatou-se o nascimento do primeiro bezerro bovino produzido *in vitro* (GONÇALVES et al., 2002).

Entre as biotecnologias reprodutivas a Produção *In Vitro* de Embriões (PIVE) é cada vez mais difundida e utilizada comercialmente em vários países (PALMA & BREM, 1993; SAUVÉ, 1998), inclusive de forma destacada e com resultados bastante promissores no Brasil, a partir da década de 90 (RODRIGUES, 1997).

Em 2000, o Brasil destacou-se no cenário mundial ao comunicar um número expressivo (12.597) de transferências de embriões produzidos por fecundação *in vitro*, marcando o sucesso comercial desta biotecnologia no país, cuja aplicação, até então, era basicamente restrita ao cenário acadêmico (VIANA, 2004). Mais recentemente, no mercado de embriões FIV, o país consolidou uma liderança absoluta respondendo por mais de 85% do total mundial, ressaltando-se a importância da técnica na reprodução do rebanho nacional. (VIANA, 2009).

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotécnica que envolve etapas de colheita de oócitos imaturos, bem como a maturação (MIV), fecundação (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) até o estágio de blastocisto. A PIVE ajuda a impedir o descarte precoce de fêmeas geneticamente privilegiadas portadoras de alterações adquiridas que inviabilizam a reprodução natural ou até mesmo a transferência de embriões. Além desse aspecto, a PIVE também permite o aprofundamento dos conhecimentos relativos aos processos fisiológicos, bioquímicos e biotecnológicos das espécies de interesse de estudo, sem a necessidade de extrapolar resultados pertinentes a animais de laboratório (GONÇALVES et al., 2002).

Um dos grandes desafios dos sistemas de cultivo de embriões é a perfeita condição de maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário *in vitro*. A grande complexidade desse sistema está nos vários ambientes através dos quais os

gametas e embriões passam durante o desenvolvimento *in vivo* (MEIRELLES et al. 2004).

Embora vários laboratórios venham tornando a PIVE mais eficiente, desenvolvendo e aplicando novas técnicas e obtendo taxas de produção razoáveis; estudos básicos e aprimoramentos técnicos ainda são necessários em todas as suas etapas, visando aumentar a eficiência quantitativa e qualitativa dos embriões produzidos (BAVISTER, 2000; GUTIÉRREZ-ADÁM et al., 2001).

Apesar de várias pesquisas, a qualidade dos embriões produzidos *in vitro* ainda continua inferior a dos blastocistos produzidos *in vivo* (RIZOS et al., 2002). Por isso, várias pesquisas no ramo da biotecnologia reprodutiva visam o melhoramento não só da quantidade, mas também da qualidade dos embriões produzidos *in vitro* (VAN DE VELDE et al., 2000).

## 2.2 FECUNDAÇÃO *IN VITRO* (FIV)

A fecundação é um processo que se inicia com o contato entre o espermatozóide e o oócito, e finda com a formação de um novo indivíduo (DE CARVALHO et al., 2002).

Até a década de 40, o conhecimento sobre a fecundação *in vitro* era baseado no estudo de oócitos de estrelas do mar. Os invertebrados marinhos foram primeiramente utilizados na pesquisa, porque, ao contrário dos mamíferos, a fecundação ocorre externamente ao sistema reprodutor da fêmea (GONÇALVES et al., 2002). Embora o primeiro estudo relativo à fecundação em mamíferos tenha ocorrido em 1935 por Pincus e Enzmann, até a década de 50 praticamente nenhum sucesso tinha sido obtido.

No final dos anos 50, tornou-se possível fecundar oócitos de mamíferos *in vitro*, abrindo caminho para uma análise dos eventos celulares e moleculares da fecundação nestes organismos. O progresso no entendimento da fecundação em mamíferos proporcionou diversos benefícios substanciais: os oócitos de mamíferos que são fecundados *in vitro* podem se desenvolver e formar indivíduos normais, quando transferidos para o útero. Dessa maneira, muitas mulheres e animais inférteis tornam-se capazes de produzir descendentes normais (VARAGO et al., 2008).

A ligação do espermatozóide ao oócito é mediada por receptores espermáticos espécie-específicos presentes na zona pelúcida. As glicoproteínas constituintes da zona pelúcida são denominadas de ZP1, ZP2 e ZP3 que apresentam importantes funções na fecundação. A ZP1 tem, basicamente, papel estrutural, enquanto que a ZP2 tem a função de receptor secundário e a ZP3, além da função de receptor primário, tem sido responsabilizada pela reação acrossômica (GONÇALVES et al., 2002).

Ao ser penetrado pelo espermatozóide, o oócito responde inicialmente com a despolarização da membrana plasmática, hidrólise do fosfatidilinositol bifosfato (PIP), aumento das oscilações intracelulares de cálcio, exocitose dos grânulos corticais, aumento do pH intracelular e da síntese protéica (GONÇALVES et al., 2002).

*In vivo*, os espermatozóides necessitam chegar à ampola do oviduto para fecundarem o oócito. *In vitro*, para que esse processo ocorra, os meios usados devem fornecer um ambiente adequado. O meio mais usado para a FIV é o Fert-Talp, que contém em sua constituição fatores capazes de promover a capacitação espermática, como a heparina, albumina sérica, cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) e bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) (CHAMBERLAND et al., 2000; GONÇALVES et al., 2007).

Para impedir a penetração de mais de um espermatozóide, ocorre o bloqueio primário da polispermia, devido à rápida despolarização da membrana plasmática do oócito após a fecundação, denominada bloqueio vitelínico. O bloqueio secundário resulta da reação cortical do oócito, também denominado reação de zona, onde os grânulos corticais são excitados para o espaço perivitelínico do oócito, liberando seu conteúdo que inclui várias enzimas que alteram a estrutura da zona pelúcida. Entre essas alterações estão a clivagem proteolítica da ZP2 e a hidrólise dos grupos de açúcar na ZP3 (WANG et al., 2003).

Para adquirir a capacidade de fecundar o oócito, o espermatozóide passa por várias modificações seqüenciais, ainda não completamente conhecidas, que incluem a capacitação e a reação acrossômica (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

## 2.3 CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA E REAÇÃO ACROSSÔMICA

Em 1952, Austin observou que espermatozoides frescos de mamíferos eram incapazes de fecundarem o oócito *in vivo* antes que eles passassem por um período de tempo dentro do trato feminino.

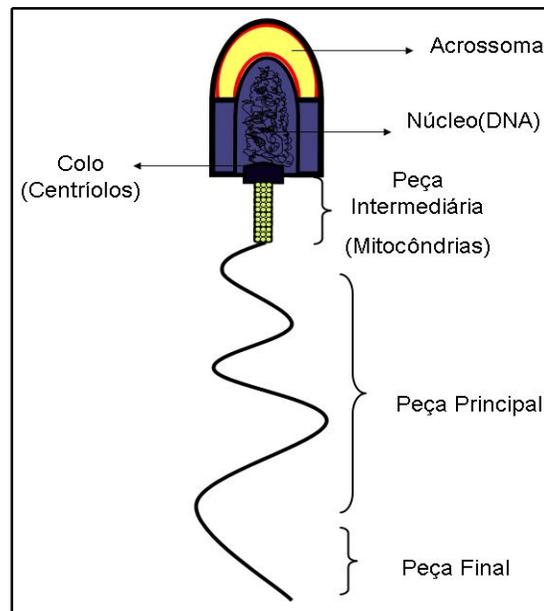
Os espermatozoides de mamíferos não possuem a habilidade para fecundar os oócitos imediatamente após a ejaculação, mesmo estando móveis e com aparente morfologia normal. No processo *in vivo*, os espermatozoides alcançam esta capacidade fecundante no trato genital feminino. A capacidade de adquirir competência fecundante, através de modificações funcionais e estruturais, foi denominada de capacitação espermática (ASSUMPÇÃO et al., 2002).

A capacitação está associada com mudanças na fisiologia e na bioquímica celular do espermatozoide. Entre elas incluem alterações nas: propriedades de superfície, tais como a composição protéica da superfície da membrana, a depleção de colesterol e localização de antígeno; propriedades da membrana plasmática, tais como o potencial de membrana, a composição lipídica e a assimetria dos fosfolípidos e a difusão lateral dos lipídeos e das proteínas; metabolismo; pH intracelular; assim como nas atividades citosólicas do cálcio e de outros íons, aumento do AMPc, bem como fosforilação de resíduos tirosina de proteínas específicas. Esta extensiva reprogramação fisiológica ocorre na cabeça e no flagelo dos espermatozoides. (O'FLAHERTY et al., 1997; VISCONTI et al., 1999; CHAMBERLAND et al., 2000; HERRERO & GAGNON, 2001).

A capacitação, *in vivo*, ocorre no trato genital feminino, porém é possível induzir a capacitação *in vitro* através da incubação de espermatozoides com fluídos do oviduto ou, para algumas espécies, em um meio definido contendo certos componentes, como heparina, albumina sérica, cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) e bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) (CHAMBERLAND et al., 2000).

A heparina tem sido utilizada no meio de capacitação espermática *in vitro* como um dos principais indutores para os espermatozoides sofrerem tais modificações e adquirirem a capacidade de fecundação. Entretanto, recentes observações têm indicado que a heparina não é necessária para induzir a capacitação espermática quando espermatozoides criopreservados de bovinos são processados pela centrifugação através do gradiente descontínuo de Percoll (MENDES JR. et al., 2003).

Muitas espécies animais, incluindo os mamíferos, contêm uma grande vesícula secretória, denominada de acrossoma, na região apical da cabeça dos espermatozoides (Figura 01). Apesar das variações no tamanho e na forma do acrossoma entre as espécies de mamíferos, é uma vesícula ácida que contém uma variedade de proteínas com atividade proteolítica, proteínas bioativos e outras de função incerta (YANAGIMACHI, 1994; HARDY, 2002).

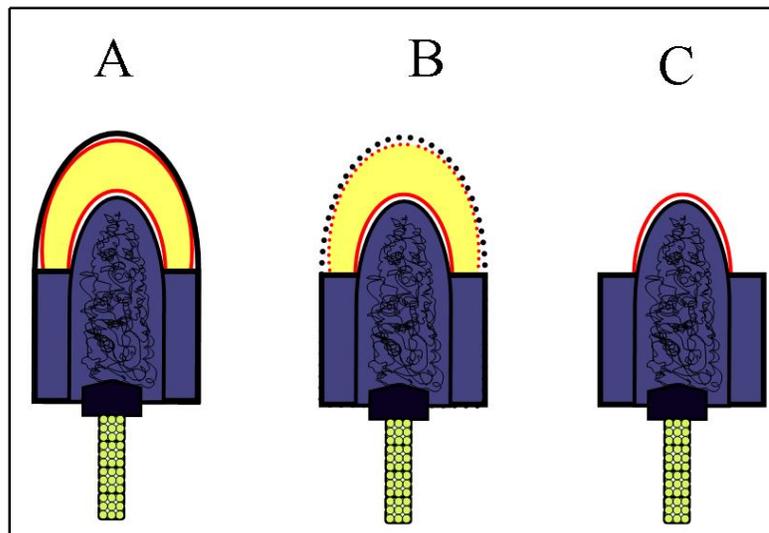


**Figura 01:** Estrutura organizacional de um espermatozoide de bovino.

Estas proteínas e peptídeos estão embebidos em uma rede com subdomínios regionais que podem ser diferenciados dentro do acrossoma com base na aparência histoquímica ou na ultraestrutura, assim como na distribuição de proteínas específicas. Este conteúdo é limitado por uma membrana vesicular contínua, que é dividida em mais três regiões: uma membrana acrossomal interna que fica em contato com a membrana nuclear, uma membrana acrossomal externa subjacente à membrana plasmática, e um segmento equatorial onde estes domínios da membrana se unem (Figura 02) (YANAGIMACHI, 1994; EDDY & O'BRIEN, 1994).

O conteúdo desta vesícula é liberado por um evento excitatório conhecido como a reação acrossômica, que consiste em processos controlados da fusão entre a membrana acrossomal externa e a membrana plasmática (Figura 02). As consequências da reação acrossômica incluem a externalização do conteúdo

acrossomal e a exposição de um novo domínio da superfície celular na região apical do espermatozóide. Tal fusão irá ocasionar a liberação de enzimas hidrolíticas, como hialuronidase e acrosina, as quais estão implicadas na penetração do espermatozóide no oócito (HAFEZ & HAFEZ, 2004; O'FLAHERTY et al., 2004; RODRIGUEZ et al., 2005).



**Figura 02:** Sequência de eventos durante a reação acrossômica em espermatozóides de bovinos. Acrosoma intacto (A); estágio de excitose caracterizado pela fusão entre a membrana acrossomal externa e a membrana plasmática (B); reação acrossômica finalizada (C).

## 2.4 ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO E NITROGÊNIO

Espécies reativas do oxigênio e nitrogênio (ERON) é um termo coletivo usado no meio científico, que inclui todos os radicais e não radicais derivados do oxigênio e nitrogênio. O radical livre é qualquer átomo ou molécula que contém um ou mais elétrons não pareados, ou seja, um número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica, o que lhe confere alta reatividade (NORDBERG & ARNÉR, 2001; SILVEIRA, 2004).

As ERONs, no estado redox, podem causar sérios distúrbios no nosso organismo e são conhecidas por terem efeitos deletérios sobre as células, quando em altas concentrações, incluindo danos ao DNA, alterações nas membranas celulares e oxidação de proteínas (JOHNSON et al., 1994; DE CARVALHO et al.,

2002; SILVEIRA, 2004). Este estresse oxidativo, que é uma circunstância associada com uma taxa aumentada dos danos celulares induzida pelo oxigênio e pelos oxidantes derivados do oxigênio, dependendo da gravidade, pode levar tanto à necrose quanto a apoptose (SURESH et al., 1995; SLATER et al., 1996).

Espermatozoides de mamíferos são extremamente sensíveis aos danos oxidativos induzidos por altas concentrações de oxigênio, o que tem sido associado à perda da motilidade e outras funções espermáticas, além da peroxidação da membrana lipídica (IWASAKI & GAGNON, 1992). Espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e outros radicais livres, são continuamente produzidos nas células e este aumento do estresse oxidativo é um dos principais fatores que prejudicam o desenvolvimento embrionário *in vitro* (DE MATOS et al., 2002).

Por outro lado, a capacitação pode ser parte de um processo oxidativo, e radicais livres como o superóxido ( $O_2$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o óxido nítrico (NO) podem participar na indução da hiperativação e capacitação de espermatozoide humano e na reação acrossômica em espermatozoides de humanos e de bovinos (O'FLAHERTY et al., 1999). Quando produzidos em concentrações muito baixas, as ERONs podem ativar eventos de sinalização celular e regular funções fisiológicas. (O'FLAHERTY et al., 2005; DREVET, 2006).

Somente no início dos anos 90 foi descoberto que concentrações muito baixas de ERONs, produzidas durante a ativação celular, desempenhava a função de segundo mensageiro e, por isso, tem funções positivas nas cascatas de transdução de sinais (LAMIRANDE & O'FLAHERTY, 2008).

## 2.5 L-ARGININA

A L-arginina, ácido (L)-2-amino-5-guanidinovalérico, é um aminoácido, praticamente sem odor, de alto ponto de fusão devido aos dois grupos polares, sendo solúvel em água e sensível à luz (NOVAES & BEAL, 2004).

Em mamíferos, a L-arginina é um aminoácido que dependendo do estágio do desenvolvimento do animal (como em animais jovens e em crescimento) ou em situações de trauma, estresse ou jejum prolongado, torna-se um aminoácido essencial, ou seja, em determinadas condições metabólicas, deixa de ser sintetizado

pelo organismo em quantidade suficiente para suprir sua necessidade (LEHNINGER, 1991; SATRIANO, 2004).

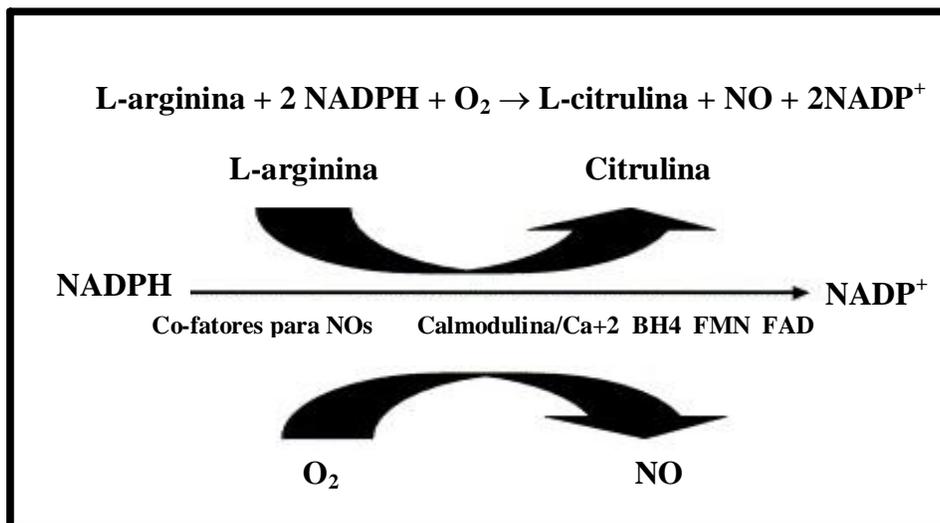
Em humanos, esse aminoácido tem sido relacionado ao aumento da imunidade, através do aumento da produção de hidroxiprolina e da função dos linfócitos-T. Esse aumento parece estar relacionado à maior liberação do hormônio do crescimento, que agiria por meio do ganho de massa muscular e pela melhora da resposta cicatricial em feridos (NOVAES & BEAL, 2004).

Como há uma solicitação metabólica contínua da L-arginina, existe uma neo-síntese deste aminoácido nos túbulos proximais renais a partir da citrulina. Proteínas ingeridas são degradadas até L-arginina, que podem ser diretamente absorvidas e utilizadas no ciclo da uréia no tecido hepático, ou transformadas no epitélio intestinal em ornitina que, juntamente com a glutamina secretada como glutamato, são convertidas em citrulina. A citrulina absorvida se transforma em L-arginina no ciclo renal. A citrulina também pode ser convertida diretamente em L-arginina no citoplasma das células endoteliais e dos macrófagos (FLORA FILHO & ZILBERSTAIN, 2000).

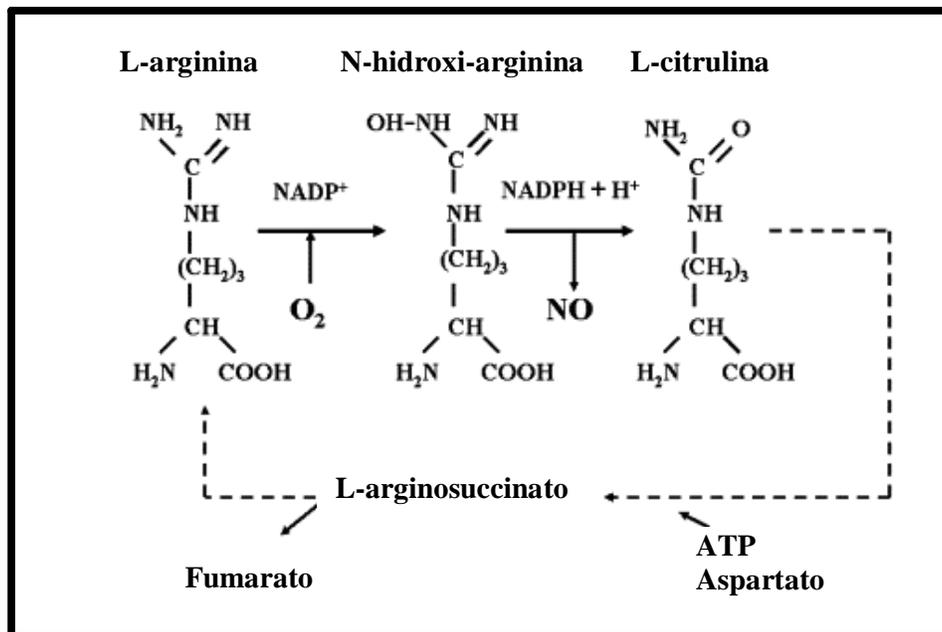
A L-arginina desempenha uma importante função, sob condições *in vitro*, na motilidade espermática em humanos, coelhos e cabras, aumentando as taxas de glicólise, resultando em maior geração de adenosina trifosfato (ATP) e lactato, elementos fundamentais para a manutenção da motilidade espermática (SRIVASTAVA et al., 2006). Além disso, segundo O'Flaherty et al. (2004), a L-arginina induz a capacitação e a reação acrossômica em espermatozóides bovinos, entretanto altas concentrações de L-arginina podem ter um efeito adverso na motilidade e fertilidade em humanos e ratos.

O'Flaherty et al. (2004) adicionou L-arginina (nas concentrações 10, 20, 30, 40, 50mM) ao meio de capacitação espermática e observou que a adição de 10 mM deste aminoácido, durante 45 (quarenta e cinco) minutos melhorou a motilidade espermática, capacitação e reação acrossômica de espermatozóides de bovinos. Maiores concentrações inibiram a motilidade e não mostraram diferença significativa em relação ao controle, quando avaliada a integridade acrossomal. Roy & Atreja (2008) verificaram que a adição de 15 e 20 mM de L-arginina diminuiu a motilidade espermática em búfalos, porém quando utilizadas concentrações menores (5 e 10 mM) aumentou a capacitação espermática.

Tem sido proposto que os efeitos benéficos da L-arginina nas funções espermáticas estão ligados ao óxido nítrico (NO), uma vez que a L-arginina serve como substrato para a enzima óxido nítrico sintase (NOs) na produção do NO, um radical livre de vida curta que tem participação na capacitação e reação acrossômica. Para a produção do NO, a NOs utiliza oxigênio e diferentes cofatores como nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatada (NADPH), flavina mononucleotídeo (FMN), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), calmodulina e cálcio, os quais podem ser encontradas no acrossoma e na cauda dos espermatozoides (O'FLAHERTY et al., 2004) (Figura 03) e esta reação pode ser parte de um ciclo no qual a L-citrulina pode ser regenerada para a L-arginina (BRUCKDORFER, 2005) (Figura 04).



**Figura 03:** Biossíntese do óxido nítrico a partir de L-arginina. Requerimento de um grande número de co-fatores. *Fonte:* Bruckdorfer, 2005.



**Figura 04:** Biossíntese do óxido nítrico a partir de L-arginina, a formação da citrulina e sua reciclagem para L-arginina. *Fonte:* Bruckdorfer, 2005.

## 2.6 ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico é uma espécie reativa do nitrogênio que age como radical livre na sinalização inter ou intracelular. É gasoso, incolor, biologicamente ativo e possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, tendo um elétron livre, gerado por quase todas as moléculas do organismo que, devido ao seu baixo peso molecular e a sua natureza lipofílica, difunde-se rapidamente pelas membranas lipídicas, o que explica adequadamente suas ações parácrinas locais sobre o músculo liso vascular ou sobre os monócitos e plaquetas que aderem ao endotélio (REVELLI et al., 2001; O'FLAHERTY et al., 2005).

O gás óxido nítrico é produzido pela desaminação da Arginina, catalisada pela enzima NO sintetase. Como ele atravessa a membrana plasmática, se difunde rapidamente para fora da célula onde foi produzido e para as células vizinhas. Ele atua somente localmente, porque tem uma meia-vida curta, de 5 a 10 segundos no espaço extracelular, antes de se converter em nitratos e nitritos pela ação do oxigênio e da água (ALBERTS et al., 2004).

As funções do NO até hoje descobertas são complexas e antagônicas. Um aspecto marcante desta molécula é a sua capacidade de ser benéfica ou potencialmente tóxica conforme a concentração ou depuração tecidual (FLORA FILHO & ZILBERSTAIN, 2000). Alguns autores, como Schmidt et al. (1994), denominam muito apropriadamente o NO como uma “faca de dois gumes”.

O NO desempenha uma importante função na modulação da resposta imune, possivelmente através da regulação da síntese de citocinas, macrófagos e outros tipos celulares que podem induzir a formação de interferon gama (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral (TNF- $\gamma$ ) e lipopolissacarídeo bacteriano. O óxido nítrico regula moléculas próprias do organismo, tais como citocinas e poliaminas, que previnem efeitos de deterioração potencial como a sepse e o choque. Além disso, o NO participa de mecanismos fisiológicos muito importantes, agindo como mensageiro intracelular no controle do tônus vascular, na neurotransmissão, na produção de hormônios, na diferenciação celular e na expressão gênica (DE CARVALHO et al., 2002).

Além disso, o NO é um importante mensageiro intercelular nos mamíferos superiores e o mecanismo de sinalização intercelular é, em geral, realizado através de receptores de membrana celular na célula alvo. Estes receptores são, habitualmente, transmembranosos tendo contato com citoplasma e desencadeando uma “cascata” de sinais intracelulares que finalizarão em uma mudança na célula (FLORA FILHO & ZILBERSTAIN, 2000).

Foi descoberto, ainda, que o NO é o ativador endógeno da guanilato ciclase solúvel, resultando na formação de GMP cíclico (GMPc), que atua como segundo mensageiro em muitas células, incluindo nervos, músculo liso, monócitos e plaquetas. O NO compartilha várias propriedades com o O<sub>2</sub>, em particular sua alta afinidade pelo grupo heme e por outros grupos de ferro-enxofre. Isto é importante para a ativação da guanilato ciclase, que contém um grupo heme, e para a inativação do NO pela hemoglobina (RANG et al., 2001; MONCADA E HIGGS, 1993).

Tem sido mostrado que o NO desempenha importantes funções no desenvolvimento inicial em mamíferos, tais como a ativação oocitária em porcos, maturação, desenvolvimento embrionário e implantação em ratos, o que tem sido evidenciado pelo alto consumo de arginina em embriões pré-implantacionais em humanos e em ratos (TESFAYE et al., 2006).

Em espermatozoides de bovinos, foi observado que o NO estimula a capacitação e a reação acrossômica. Entretanto, assim como a L-arginina, altas concentrações de NO induzem a toxicidade e diminuem a motilidade de espermatozoides humanos, o que pode ser causado por uma significativa redução na concentração de AMPc, um importante requisito para a motilidade do espermatozoide (O'FLAHERTY et al., 2004), além de estar também envolvido, através da ativação de proteínas quinases, na seqüência de eventos que culmina na reação acrossômica (RODRIGUEZ et al., 2005).

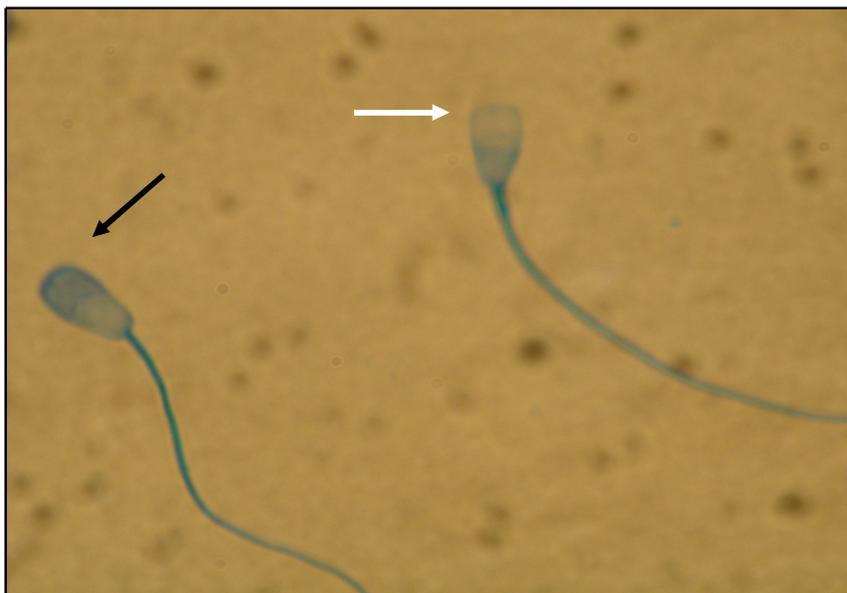
Estudos *in vitro* têm mostrado que baixas concentrações de um composto liberador de NO, nitroprussiato de sódio (SNP), mantém a motilidade e viabilidade de espermatozoides de humanos (HELLSTROM et al., 1994). NO exógeno, além de estimular a capacitação e reação acrossômica em bovinos e humanos, estimula a hiperativação de espermatozoides de ratos (HERRERO et al., 1994). Segundo Hou et al. (2008), baixas concentrações de SNP aumentam a motilidade em hamster, porém, em várias concentrações, diminuem a motilidade espermática em humanos.

A demonstração da produção de NO é ainda difícil, sendo sempre feita de maneira indireta. Aliás, todas as pesquisas pioneiras não demonstraram o NO propriamente dito devido sua evanescência, considerando-se a concentração de nitrito e nitrato como prova de sua produção. Outro método de demonstrar o NO, é a substituição do substrato por um análogo (L-NNA ou L-NMMA ou L-NAME) sendo a ausência do efeito pesquisado imputado pela não formação de NO devido ao bloqueio da reação da L-arginina à L-citrulina (FLORA FILHO & ZILBERSTAIN, 2000).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 AVALIAÇÃO DA CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA

A avaliação da capacitação espermática foi feita através da taxa de reação acrossômica. Os espermatozoides foram corados com solução de Coomassie de azul brilhante – G250 (0,0022g/mL em solução de 50% de metanol, 10% de ácido acético e água ultra pura q.s.p. (BENDAHMANE et al., 2002) por 2 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas cuidadosamente com água, cobertas com glicerol (90%, 10% de PBS) e avaliadas sob microscópio de luz com aumento de até 1000x. Um total 200 células/lâmina foi analisado. As células que apresentavam acrossoma com coloração azul-escuro foram consideradas reação acrossômica negativa e as que mostravam o acrossoma de coloração azul-claro reação acrossômica positiva (Figura 05).



**Figura 05:** Fotomicrografia mostrando espermatozoides reação acrossômica negativa (seta preta) e reação acrossômica positiva (seta branca).

## 3.2 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

### 3.2.1 Coleta de Ovários e Punção Folicular

Ovários bovinos foram obtidos de abatedouro (Matadouro Frigorífico da Sociedade Cooperativa dos Pecuaristas - SOCIPE), lavados com álcool 70% e acondicionados em frascos com solução salina estéril a 0,9 % de NaCl. Foram transportados, à temperatura ambiente, até o Laboratório de Fertilização *In Vitro* da Universidade Federal do Pará em um período aproximado de 2 horas.

No laboratório, os folículos ovarianos medindo entre 2 a 8 mm de diâmetro foram puncionados com o auxílio de agulha 40 x 12 acoplada a uma seringa de 10 mL. O fluido folicular foi depositado em tubos de 15 mL, onde permaneceram durante 10 minutos para sedimentação.

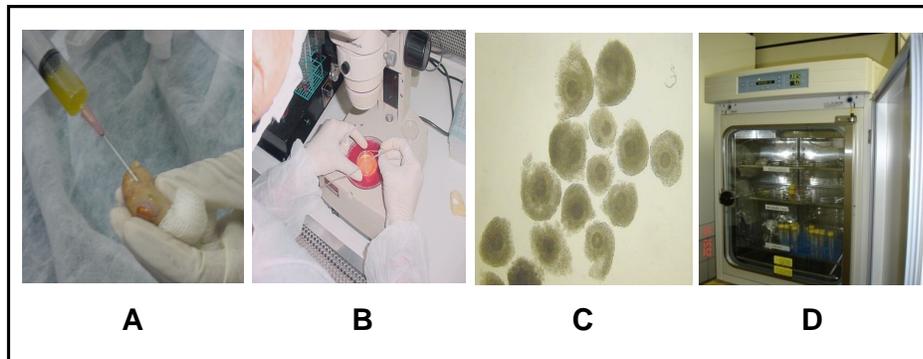
### 3.2.2 Rastreamento e Seleção dos Complexos-*Cumulus*-Oócito (COC)

Após a sedimentação, o sobrenadante, representado pelo líquido folicular, foi descartado e o sedimento colocado em placas de Petri (35 mm de diâmetro) para o procedimento de rastreamento e seleção, sob fluxo laminar e auxílio de lupa estéreo-microscópica. Os oócitos bovinos foram selecionados e classificados de acordo com características morfológicas, como a presença de *cumulus oophorus* compacto, contendo mais de quatro camadas de células, ooplasma com granulações finas, aspecto homogêneo, coloração marrom e circunferência regular. Os COC selecionados foram lavados em TCM-199 suplementado com Hepes, antibióticos e 10% de soro fetal bovino (SFB).

### 3.2.3 Maturação *In Vitro* (MIV)

Os oócitos foram lavados e incubados em meio de MIV (TCM-199 suplementado com bicarbonato de sódio, 10% SFB, 50 µg/mL de penicilina, 50 µg/mL de gentamicina, 0,5 µg/mL de FSH, 5,0 µg/mL de LH, 11 mg/mL de piruvato.

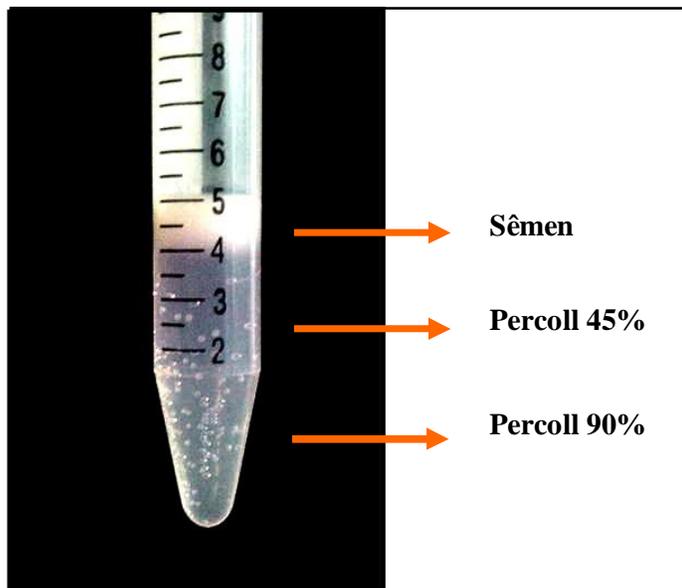
A incubação foi feita em placas de petri com gotas de 100  $\mu$ L de meio de MIV sob óleo mineral estéril (10 a 15 oócitos por gota), em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%, com 38,5°C de temperatura e atmosfera úmida, durante 18 horas (Figura 06).



**Figura 06:** Fotografia mostrando as etapas de aspiração folicular (A), seleção (B) do complexo *cumulus*-oócito de qualidade 1 e 2, (C) sob estereomicroscópio e (D) maturação *in vitro* em estufa com 38,5°C e alta umidade.

### 3.2.4 Fecundação *In Vitro* (FIV)

Para a FIV, o sêmen de dois touros, um *Bos taurus* (raça Simental) e um *Bos indicus* (raça Nelore), foram descongelados a 35 °C por 30 segundos e depositado, cautelosamente, sobre tubos correspondentes contendo gradiente descontínuo de Percoll (45/90%) (Figura 07). Após isso, os tubos foram submetidos à centrifugação durante 7 minutos a 200 g, para remoção do diluidor e separação dos espermatozoides vivos dos mortos. Após o término da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* resultante centrifugado novamente, durante 3 minutos, em 2 mL de meio de FIV [TL-Stock suplementado com heparina, penicilamina, hipotaurina, epinefrina e albumina sérica bovina (BSA) segundo Parrish et al. (1988)] para remoção dos resíduos de Percoll. Em seguida, os espermatozoides foram incubados, nas mesmas condições citadas para a MIV, em 2 mL de meio de FIV para sofrerem capacitação.



**Figura 07:** Sêmen sobre gradiente de densidade descontínuo de Percoll.

Após os respectivos períodos de capacitação de cada grupo experimental, a concentração espermática foi ajustada para  $10^6$  espermatozóides por mL. Os COCs (após 18 horas de MIV) e espermatozóides foram unidos de acordo com os Grupos experimentais, em gotas de 80  $\mu$ L de meio de FIV e mantidos sob as mesmas condições de cultivo citadas para a MIV.

### 3.2.5 Dosagem de Nitrato/Nitrito ( $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ )

Após a FIV (30 horas), o meio da gota onde estavam incubados espermatozóides e oócitos foi congelado para a posterior mensuração da concentração de  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  produzida durante a FIV. Para isto, utilizou-se o método colorimétrico de Griess (RICART-JANÉ et al., 2002). O reagente de Griess é composto de uma mistura de sulfanilamida 2% e N-(1-naphthil) etilenediamina 0,2% em água ultra-pura. A primeira reação na amostra ocorre com o nitrito para formar o sal diazonizado que reage com o segundo reagente para formar a cor púrpura com um pico de absorvância de 540 nm. Para reduzir o nitrato a nitrito, as amostras (40  $\mu$ L) foram incubadas com 40  $\mu$ L de uma mistura contendo 1000  $\mu$ L da enzima nitrato redutase oriunda de bactéria (100  $\mu$ L da enzima (10 UI) diluída em água ultra-pura +

900 µL de água ultra-pura), 1000 µL do cofator NADPH (5mg/mL diluído em água ultra-pura) e 1000 µl de tampão fosfato de potássio (0,5 M). As amostras foram incubadas a 37 °C por 14-16 h. Posteriormente, 80 µl do reagente de Griess foram adicionados às amostras.

### **3.2.6 Cultivo *In Vitro* (CIV)**

Para dar suporte ao desenvolvimento embrionário foi realizado um sistema de co-cultivo dos embriões bovinos em monocamada de células da granulosa oriundas do *cumulus oophorus* dos oócitos, que aderiram à placa de cultivo durante a MIV formando uma monocamada. O meio de MIV foi substituído por 100 µL de meio de cultivo embrionário e a placa com a monocamada permanecendo incubada em estufa de CO<sub>2</sub>, aguardando o momento da transferência dos embriões. O meio de cultivo utilizado foi o meio SOF (*synthetic oviduct fluid*) suplementado com 6 mg/mL de BSA, 10% de SFB e antibióticos, segundo Tervit et al. (1972).

Após 24 a 28 horas na gota de FIV, os prováveis zigotos foram submetidos à sucessivas pipetagens para retirada das células do *cumulus oophorus* restantes e dos espermatozóides aderidos à zona pelúcida, sendo então transferidos (15 a 20) para gotas de cultivo correspondentes aos grupos experimentais, onde permaneceram até o fim do cultivo.

## **3.3 ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO**

### **3.3.1 Análise Quantitativa**

- Taxas de fecundação (após 18 horas no meio de FIV). Para essa análise os prováveis zigotos foram fixados entre lâminas e lamínulas conservadas em etanol:acético e, posteriormente, coradas com orceína acética e observadas sob microscópio;

- Taxa de clivagem foi realizada no segundo dia de cultivo;

- Taxa de formação de blastocisto realizada no sétimo dia de cultivo.

### 3.3.2 Análise Qualitativa

- Cinética do desenvolvimento através da taxa de formação de blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto eclodido, no sétimo dia de cultivo;

- Contagem do número total de células. Para isso os embriões (no sétimo dia de cultivo) foram fixados em formol salino, marcados com o fluorocromo Hoechst 33342 (10 µg/mL) e observados sob microscopia de fluorescência.

## 3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

### 3.4.1 Experimento 1: Ação da L-arginina no processo de reação acrossômica.

Neste experimento foram utilizados o sêmen de dois touros de raças diferentes (*Bos indicus* - raça Nelore e *Bos taurus* - raça simental). Inicialmente foi avaliado o efeito dose resposta da adição de diferentes concentrações de L-arginina (0 mM, 1 mM, 10 mM e 50 mM) no meio de capacitação espermática *in vitro* (Talp-FIV) nos tempos 0, 1, 2 e 3 horas (T0, T1, T2 e T3, respectivamente) para verificar a relação entre a concentração de L-arginina e o tempo de ocorrência da reação acrossômica nos espermatozóides de dois touros de raças diferentes.

Através da coloração descrita anteriormente, foi analisado a integridade do acrossoma dos espermatozóides, ou seja, reação acrossômica negativa ou positiva.

### 3.4.2 Experimento 2: Efeito da L-arginina durante a FIV na produção *in vitro* de embriões.

No experimento 2 foram utilizadas as mesmas concentrações de L-arginina do experimento 1 (0 mM, 1 mM, 10 mM e 50 mM). Porém, neste experimento, tais concentrações foram utilizadas durante o período da FIV (em que espermatozóides e COCs estavam incubados juntos, aproximadamente 30 horas), avaliando o seu efeito através das taxas de desenvolvimento embrionário (taxas de

fecundação, clivagem, formação de blastocisto, cinética do desenvolvimento embrionário e do número total de células).

A produção de NO durante a FIV foi avaliada através da dosagem de nitrato/nitrito ( $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ ) no meio de FIV dos grupos utilizados neste experimento.

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores percentuais de dosagem de nitrato/nitrito ( $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ ), das taxas de reação acrossômica, clivagem e blastocisto (análise quantitativa), assim como as médias do número total de células e da cinética do desenvolvimento dos blastocistos obtidos (análise qualitativa) foram submetidos à ANOVA, com o pós-teste de Tukey, adotando-se o nível de significância de 5%, com auxílio do programa BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 EXPERIMENTO 1

#### 4.1.1 Análise das taxas de reação acrossômica

Neste trabalho ao analisar a capacitação espermática *in vitro*, utilizando o sêmen de dois touros de raças diferentes (*Bos taurus* e *Bos indicus*), através das taxas de reação acrossômica, observou-se que a L-arginina aumentou de forma significativa ( $p < 0,05$ ) tal taxa quando adicionada ao meio de capacitação espermática, durante duas horas, nas concentrações de 1 mM (utilizando o sêmen do touro *Bos taurus*) ( $31,1 \pm 2,78$ ) e 10 mM (utilizando o sêmen do touro *Bos indicus*) ( $32,9 \pm 2,8$ ) (Tabela 01).

A avaliação das taxas de reação acrossômica em *Bos taurus* mostrou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na velocidade da reação nos Grupos expostos a L-arginina. Uma vez que tal diferença ocorreu para 1 mM ( $21,7 \pm 1,93$  vs.  $31,1 \pm 2,78$ ), 10 mM ( $19,5 \pm 2,67$  vs.  $27,9 \pm 1,96$ ) e 50 mM ( $17,6 \pm 2,49$  vs.  $28,8 \pm 4,09$ ) no intervalo de T1 para T2, respectivamente. Enquanto no Grupo Controle ( $23,4 \pm 2,65$  vs.  $31,4 \pm 2,7$ ) tal diferença só observada do intervalo T2 para T3, respectivamente.

Foram realizadas 4 repetições, sendo que em cada repetição foram analisados 200 espermatozoides de cada grupo experimental quanto a reação acrossômica positiva ou negativa.

**Tabela 01:** Médias  $\pm$  desvio padrão das taxas (%) de reação acrossômica em *Bos taurus* e *Bos indicus* sob diferentes concentrações e tempos de exposição à L-arginina.

Grupos	Tempo (h)			
	0	1	2	3
	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$
<b><i>Bos taurus</i></b>				
Controle	8,1 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup>	19,7 $\pm$ 3,86 <sup>b</sup>	23,4 $\pm$ 2,65 <sup>b A</sup>	31,4 $\pm$ 2,7 <sup>c</sup>
1 mM	8,6 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup>	21,7 $\pm$ 1,93 <sup>b</sup>	31,1 $\pm$ 2,78 <sup>c B</sup>	32,4 $\pm$ 2,7 <sup>c</sup>
10 mM	9,0 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	19,5 $\pm$ 2,67 <sup>b</sup>	27,9 $\pm$ 1,96 <sup>c AB</sup>	34,1 $\pm$ 3,9 <sup>c</sup>
50 mM	9,4 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	17,6 $\pm$ 2,49 <sup>b</sup>	28,8 $\pm$ 4,09 <sup>c AB</sup>	30,5 $\pm$ 1,8 <sup>c</sup>
<b><i>Bos indicus</i></b>				
Controle	8,9 $\pm$ 1,9 <sup>a</sup>	23,9 $\pm$ 4,5 <sup>b</sup>	26,0 $\pm$ 1,6 <sup>b AB</sup>	30,9 $\pm$ 3,9 <sup>b</sup>
1 mM	8,6 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	27,8 $\pm$ 4,0 <sup>b</sup>	28,3 $\pm$ 3,6 <sup>b AB</sup>	30,5 $\pm$ 2,7 <sup>b</sup>
10 mM	9,0 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	26,3 $\pm$ 4,7 <sup>b</sup>	32,9 $\pm$ 2,8 <sup>b B</sup>	32,5 $\pm$ 3,5 <sup>b</sup>
50 mM	9,4 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	26,0 $\pm$ 5,6 <sup>b</sup>	28,4 $\pm$ 2,8 <sup>b AB</sup>	32,4 $\pm$ 3,0 <sup>b</sup>

$\bar{x} \pm DP$  = média  $\pm$  desvio padrão;

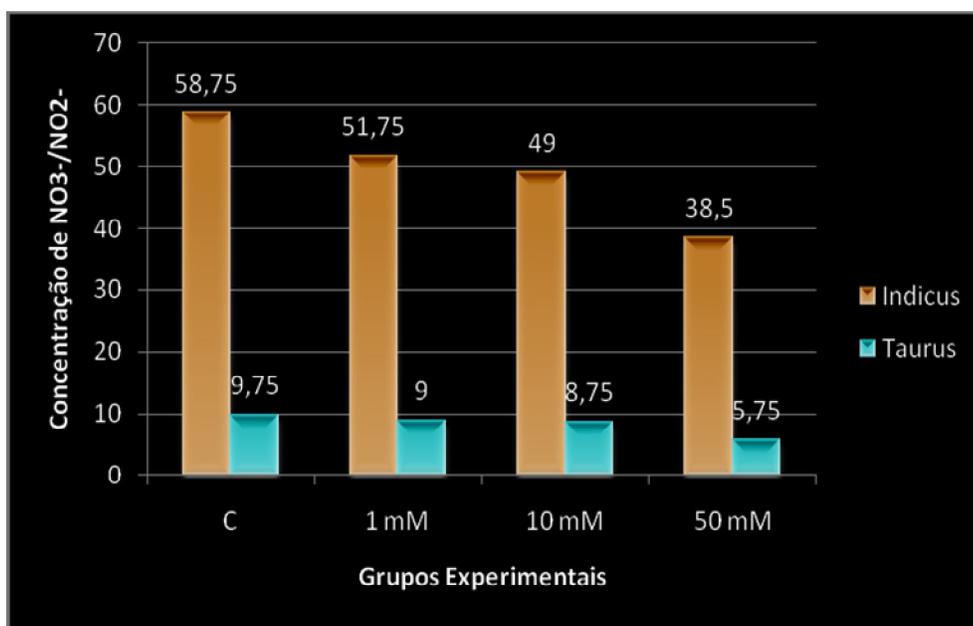
<sup>a, b, c</sup> Diferentes sobrescritos na mesma linha diferem significativamente entre os tempos na mesma concentração ( $p < 0,05$ );

<sup>A, B, C</sup> Diferentes sobrescritos na mesma coluna diferem significativamente entre as concentrações no mesmo tempo ( $p < 0,05$ ).

## 4.2 EXPERIMENTO 2

### 4.2.1 Dosagem de Nitrato/Nitrito ( $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ ) no meio de FIV

Quando utilizou-se tanto o sêmen de um touro *Bos taurus* quanto o sêmen de *Bos indicus*, observou-se que houve uma diminuição, porém sem haver diferença significativa ( $p > 0,05$ ), da concentração de  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  de acordo com o aumento da concentração de L-arginina utilizada, ou seja, quanto maior a concentração de L-arginina usada no meio FIV, menor foi a produção de  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  no mesmo. Entretanto, observou-se uma maior produção de  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  ( $p < 0,05$ ), em todos os grupos experimentais, quando utilizou-se o sêmen de *Bos indicus* (58,75; 51,75; 49; 38 vs 9,75; 9; 8,75; 5,75) (Figura 08).



**Figura 08:** Gráfico ilustrando as concentrações de  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  produzidas no meio de FIV utilizando as diferentes concentrações de L-arginina e o sêmen de *Bos indicus* (barras azuis) e *Bos taurus* (barras vermelhas).

### 4.2.2 Taxa de Fecundação (18 hpi)

Para obtenção da taxa de fecundação foram utilizados 302 oócitos, sendo que 154 foram fecundados com sêmen de um touro da raça *Bos taurus* e 148 fecundados com sêmen de um touro da raça *Bos indicus*. Foram realizadas 4

repetições e a distribuição entre os grupos experimentais deu-se da seguinte forma, respectivamente: Grupo Controle (n = 27; n = 32), Grupo 1 mM de arginina (n = 48; n = 41), Grupo 10 mM (n = 43; n = 34) e Grupo 50 mM de L-arginina (n = 36; n = 41).

Não foi observada diferença estatística ( $p > 0,05$ ) quando comparadas as taxas de oócitos fecundados, polispérmicos e não fecundados, utilizando as diferentes concentrações de L-arginina e o sêmen dos dois touros em questão, exceto quando comparada a taxa de oócitos não fecundados entre os grupos de 10 mM ( $11,6 \pm 0,57$ ) e 50 mM ( $30,6 \pm 4,8$ ) de L-arginina, quando utilizado o sêmen do touro *Bos taurus* (Tabela 02).

**Tabela 02:** Taxas de oócitos bovinos fecundados, polispérmicos e não fecundados *in vitro* nos diferentes grupos experimentais.

Grupos	n	Fecundados	Polispérmicos	Não fecundados
		$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$
<b><i>Bos taurus</i></b>				
Controle	27	$70,4 \pm 2,5$	$7,4 \pm 1,54$	$22,2 \pm 1^{AB}$
1 mM	48	$70,8 \pm 1,52$	$14,6 \pm 0,57$	$14,6 \pm 0,57^{AB}$
10 mM	43	$76,7 \pm 3$	$11,6 \pm 1,4$	$11,6 \pm 0,57^A$
50 mM	36	$63,9 \pm 2,88$	$5,6 \pm 0,57$	$30,6 \pm 4,8^B$
<b><i>Bos indicus</i></b>				
Controle	32	$75 \pm 2,64$	$6,3 \pm 0,57$	$18,8 \pm 2,64^{AB}$
1 mM	41	$75,6 \pm 1,52$	$9,8 \pm 1,4$	$14,6 \pm 1^{AB}$
10 mM	34	$73,5 \pm 1,52$	$5,9 \pm 0,57$	$20,6 \pm 1,52^{AB}$
50 mM	41	$68,3 \pm 2,3$	$7,3 \pm 1$	$24,4 \pm 1,52^{AB}$

<sup>A, B, C</sup> Diferentes sobrescritos na mesma coluna diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).

n= número amostral

$\bar{x} \pm DP$  = média  $\pm$  desvio padrão

### 4.2.3 Taxas de Clivagem (D2) e Blastocisto (D7)

Para obtenção das taxas de clivagem e blastocisto foram utilizados 792 oócitos, sendo que 394 foram fecundados com sêmen de um touro da raça *Bos taurus* e 398 fecundados com sêmen de um touro da raça *Bos indicus*. A distribuição entre os grupos experimentais deu-se da seguinte forma, respectivamente: Grupo Controle (n = 99; n = 99), Grupo 1 mM de L-arginina (n = 98; n = 100), Grupo 10 mM (n = 98; n = 99) e Grupo 50 mM de L-arginina (n = 99; n = 100).

Analisando a tabela 03, observa-se que no grupo 50 mM de L-arginina - *Bos indicus* ( $45 \pm 7,2$ ) houve uma redução significativa na taxa de clivagem em relação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ). Observou-se também que houve uma redução significativa na taxa de clivagem dos grupos 50 mM de L-arginina - *Bos taurus* e 10 mM de L-arginina - *Bos indicus* ( $65,7 \pm 9,32$ ;  $67,7 \pm 2,51$ ; respectivamente) em relação aos grupos Controle e 1 mM - *Bos taurus* ( $78,7 \pm 2,17$ ;  $77,6 \pm 2,88$ ; respectivamente) ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença significativa entre os demais grupos ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 03:** Taxas de clivagem e blastocisto dos embriões bovinos produzidos *in vitro* nos diferentes grupos experimentais.

Grupos	n	Clivagem $\bar{x} \pm DP$	Blastocisto $\bar{x} \pm DP$
<b><i>Bos taurus</i></b>			
Controle	99	$78,7 \pm 2,17^A$	$39,4 \pm 3,78^A$
1 mM	98	$77,6 \pm 2,88^A$	$34,7 \pm 4,55^A$
10 mM	98	$74,5 \pm 3,78^{AB}$	$36,7 \pm 4,32^A$
50 mM	99	$65,7 \pm 9,32^B$	$15,2 \pm 6,12^B$
<b><i>Bos indicus</i></b>			
Controle	99	$72,7 \pm 3,36^{AB}$	$39,4 \pm 4,39^A$
1mM	100	$74 \pm 4,18^{AB}$	$40 \pm 6,12^A$
10 mM	99	$67,7 \pm 2,51^B$	$37,4 \pm 3,36^A$
50 mM	100	$45 \pm 7,12^C$	$16 \pm 8,54^B$

<sup>A, B, C</sup> Diferentes sobrescritos na mesma coluna diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).  
n= número amostral

Ao analisar as taxas de blastocisto, observa-se que nos grupos 50 mM de L-arginina tanto com o sêmen *Bos taurus* quanto com *Bos indicus* ( $15,2 \pm 6,12$ ;  $16 \pm 8,54$ ; respectivamente) houve uma redução estatisticamente significativa em relação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ). Comparando-se os grupos Controle, 1 mM e 10 mM de L-arginina, de ambos os touros, observou-se que não houve diferença estatística significativa entre si ( $p > 0,05$ ).

#### 4.2.4 Cinética do Desenvolvimento Embrionário

Ao analisar a cinética do desenvolvimento embrionário, em 4 repetições, não foi observada diferença estatística significativa quando comparadas as taxas de blastocisto inicial (BI), blastocisto (BL) e blastocisto expandido (BX) entre os diversos grupos, tanto utilizando o sêmen de touro *Bos taurus* quanto o de *Bos indicus*. Entretanto, quando analisada a taxa de blastocisto eclodido (BE) entre os grupos, observou-se que a adição de 1 mM de L-arginina utilizando o sêmen de touro *Bos indicus*, aumentou significativamente a quantidade de blastocistos eclodidos quando comparada com os grupos Controle e 1 mM de L-arginina - *Bos taurus* e 10 mM e 50 mM de L-arginina - *Bos indicus* ( $32,7 \pm 10,8$  vs  $12,5 \pm 8,9$ ;  $12,5 \pm 13,8$ ;  $13,2 \pm 8,9$ ;  $6,6 \pm 14,9$ ; respectivamente) ( $p < 0,05$ ).

Ao analisar a distribuição de BI, BL, BX e BE no sétimo dia de cultivo em cada grupo experimental, observou-se semelhança em tal distribuição em todos os grupos, na qual prevaleceram BL e BX, exceto no grupo de 1 mM de L-arginina - *Bos indicus* onde prevaleceram embriões expandidos e eclodidos ( $39,1 \pm 11,5$ ;  $32,7 \pm 10,8$ , respectivamente) (Tabela 04).

**Tabela 04:** Cinética do desenvolvimento no sétimo (7<sup>o</sup>) dia de cultivo.

Grupos	n	Bi (%)	BL (%)	BX (%)	BE (%)
		$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$	$\bar{x} \pm DP$
<b><i>Bos taurus</i></b>					
Controle	39	15,5±10,8 <sup>b</sup>	31,5±19 <sup>ab</sup>	40,4±9,9 <sup>a</sup>	12,5±8,9 <sup>bB</sup>
1 mM	34	21,4±11,8 <sup>ab</sup>	24,4±13,4 <sup>ab</sup>	39,6±19,5 <sup>a</sup>	12,5±13,8 <sup>bB</sup>
10 mM	36	14,4±10,2 <sup>b</sup>	33,4±14,3 <sup>a</sup>	30,2±17,2 <sup>ab</sup>	21,9±10,7 <sup>abAB</sup>
50 mM	15	13,3±18,2	38,3±37	26,6±25,2	21,6±21,7 <sup>AB</sup>
<b><i>Bos indicus</i></b>					
Controle	39	12,5±8,9 <sup>b</sup>	24,3±19,6 <sup>ab</sup>	38,1±10,8 <sup>a</sup>	27,3±15,7 <sup>abAB</sup>
1 mM	40	13±9 <sup>c</sup>	15±9,9 <sup>bc</sup>	39,1±11,5 <sup>a</sup>	32,7±10,8 <sup>abA</sup>
10 mM	37	16,2±5 <sup>bc</sup>	30±7,4 <sup>ab</sup>	40,7±9,3 <sup>a</sup>	13,2±8,9 <sup>cB</sup>
50 mM	16	13,3±18,2 <sup>b</sup>	23,3±27,8 <sup>ab</sup>	56,6±27,9 <sup>a</sup>	6,6±14,9 <sup>bB</sup>

<sup>a, b, c</sup> Diferentes sobrescritos na mesma linha diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).

<sup>A, B, C</sup> Diferentes sobrescritos na mesma coluna diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).

n= número amostral

Blastocisto inicial (BI), blastocisto (BL), blastocisto expandido (BX) e blastocisto eclodido (BE) ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.5 Taxa do Número de Células de Blastocistos (D7)

Nas 4 repetições realizadas, analisando a qualidade embrionária (Tabela 05), observou-se que todas as concentrações de L-arginina (0, 1, 10 e 50 mM), utilizadas durante o processo de fecundação *in vitro*, tanto com o sêmen de um touro *Bos taurus* quanto o de um touro *Bos indicus*, não influenciaram na qualidade embrionária (taxa de blastocistos, blastocistos expandidos e da somatória de blastocistos e blastocistos expandidos), não havendo diferença estatisticamente significativa entre o grupo Controle e os grupos tratamentos ao utilizar-se sêmen de

touro *Bos taurus* ( $102,3 \pm 32,3$ ;  $101,2 \pm 32,1$ ;  $112,8 \pm 41,6$ ;  $90,5 \pm 25,9$ ; respectivamente) nem de touro *Bos indicus* ( $102,8 \pm 33,5$ ;  $111,4 \pm 28,4$ ;  $107,4 \pm 32,7$ ;  $96,1 \pm 34,4$ ; respectivamente) ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 05:** Avaliação qualitativa dos embriões fixados no sétimo dia de cultivo.

<b>Grupos</b>	<b>n</b>	<b>Número de células</b> $\bar{x} \pm DP$
<b><i>Bos taurus</i></b>		
<b>Controle</b>	26	$102,3 \pm 32,3$
<b>1 mM</b>	18	$101,2 \pm 32,1$
<b>10 mM</b>	26	$112,8 \pm 41,6$
<b>50 mM</b>	14	$90,5 \pm 25,9$
<b><i>Bos indicus</i></b>		
<b>Controle</b>	26	$102,8 \pm 33,5$
<b>1 mM</b>	27	$111,4 \pm 28,4$
<b>10 mM</b>	25	$107,4 \pm 32,7$
<b>50 mM</b>	8	$96,1 \pm 34,4$

n= número amostral

$\bar{x} \pm DP$  = média  $\pm$  desvio padrão

## 5 DISCUSSÃO

O'Flaherty et al. (2004) observaram que a adição de L-arginina (10 mM) ao meio de capacitação durante 45 minutos, aumentou a taxa de reação acrossômica em espermatozóides da raça *Bos indicus*. Tais resultados são semelhantes aos encontrados neste trabalho para *Bos indicus*, porém o tempo de exposição em que se observou tal influência foi maior (2 horas). Já em espermatozóides bubalinos bons resultados foram obtidos com 5 mM e 10 mM de L-arginina (ROY & ATREJA, 2008)

Vários trabalhos relacionam os efeitos benéficos da L-arginina nas funções espermáticas, uma vez que a mesma serve de substrato para a enzima NOs na produção do NO. O NO é um potente sinalizador celular e que apresenta importante participação na capacitação e reação acrossômica (O'FLAHERTY et al., 2004). Tal influência foi comprovada pela diminuição na taxa de reação acrossômica após utilização de inibidores de NOs ou de NO (HERRERO et al., 1996; VIGGIANO et al., 1996; FUNAHASHI, 2002; O'FLAHERTY et al., 2004).

A demonstração da produção de NO é difícil, em função de ter uma meia-vida curta, de 5 a 10 segundos no espaço extracelular, sendo sempre feita de maneira indireta através da concentração de nitrito e nitrato (FLORA FILHO & ZILBERSTAIN, 2000). Neste contexto, alguns autores observaram aumento na produção de  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  em função da concentração de L-arginina adicionada ao meio de capacitação por um período de 5 horas (LEAL et al., 2009). No entanto, a avaliação da produção de  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  neste trabalho não revelou diferença, dentro da mesma raça, entre os grupos experimentais, tanto em *Bos taurus* como em *Bos indicus*. Sendo importante ressaltar que tal avaliação foi realizada no meio de FIV (30 hpi), ou seja, sob influência de outros fatores como período de exposição e presença dos complexos *cumulus*-oócito.

Entretanto, quando comparado entre as raças, observou-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na concentração de  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  do *Bos indicus* sobre *Bos taurus*, sugerindo que espermatozóides da raça *Bos indicus* tem uma maior metabolização de L-arginina.

De acordo com as condições estabelecidas neste trabalho, não foram observadas melhorias nas taxas de fecundação *in vitro* como as obtidas por Leal et al. (2009), que observaram um aumento de 21% ao adicionar 10 mM de L-arginina

ao meio de capacitação espermática durante cinco horas e, em seguida, co-incubarem tais espermatozóides com oócitos maturados *in vitro*. Entretanto diferenças no processo de capacitação podem ter influenciado nestes resultados, uma vez que os espermatozóides foram capacitados na mesma gota em que ocorreu a fecundação, ou seja, na presença dos complexos *cumulus*-oócito.

A maioria dos trabalhos com L-arginina, em mamíferos, não extrapolam seu efeito a processos posteriores como desenvolvimento embrionário *in vitro*. Neste estudo foi descrito pela primeira vez o uso da L-arginina durante o processo de fecundação e seu efeito no desenvolvimento embrionário em bovinos. Neste contexto foi observada uma redução significativa nas taxas de clivagem e blastocisto quando adicionado 50 mM de L-arginina ao meio de FIV. Além de terem sido observadas várias clivagens irregulares e atrasadas em relação aos demais (observação pessoal).

Entretanto, não observa-se uma hipótese que explique o fato da alta concentração de L-arginina ter sido prejudicial ao desenvolvimento do embrião através da produção de  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ , uma vez que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) na produção destes metabólitos dentro da mesma raça. Talvez a alta concentração de L-arginina tenha influenciado no desenvolvimento embrionário através de outras vias desconhecidas até então.

De acordo com os resultados obtidos, são necessários mais estudos relacionadas a questão dose-resposta, tempo de exposição e, principalmente, com relação as condições de capacitação, uma vez que o sistema de co-incubação direta com o gameta feminino, utilizada neste trabalho, pode ter sido prejudicial ao oócito, influenciando no subsequente desenvolvimento do embrião. Com isso, torna-se importante avaliar mais afundo o real potencial da L-arginina na produção *in vitro* de embriões.

## 6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, observou-se que a suplementação de L-arginina (1 mM) durante a capacitação espermática, por duas horas, utilizando o sêmen do touro *Bos indicus*, aumentou a taxa de reação acrossômica. Entretanto, quando adicionada durante a FIV (50 mM), tanto em *Bos taurus* quanto em *Bos indicus*, diminuiu as taxas de clivagem e blastocisto, não tendo efeito no número de células (qualidade) de blastocistos analisados no sétimo dia de cultivo. Dessa forma, conclui-se que a L-arginina não melhorou o processo de fecundação *in vitro* nem o subsequente desenvolvimento embrionário.

## REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 4. ed. - Porto Alegre: Artmed, 2004.

AYRES, M. et al. **BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 2007.

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DA PECUÁRIA DE CORTE- ANUALPEC. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, p. 369, 2007;

ASSUMPÇÃO, M. E. O. A. et al. Capacitação espermática *in vitro* com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade de touros. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, Brasil, 2002.

AUSTIN C.R.. The capacitation of the mammalian sperm. **Nature**, 170, p.326, 1952.

BAVISTER, B. D.. Interactions between embryos and the culture milieu. **Theriogenology**, 53, p.619-626, 2000.

BENDAHMANE, M.; ZENG, H.T.; TULSIANI, R.P.. Assessment of acrosomal status in rat spermatozoa: studies on carbohydrate and non-carbohydrate agonists. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 404, p.38-47, 2002.

BRUCKDORFER, R.. The basics about nitric oxide. **Molecular Aspects of Medicine**, 26, p.3-31, 2005.

CHAMBERLAND, A. et al. The effect of heparin on motility parameters and protein phosphorylation during bovine sperm capacitation. **Theriogenology** 55, p.823-835, 2000.

DE CARVALHO, O. F. et al. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 38, n.1, p.33-38, Rio de Janeiro, 2002.

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

DREVET, J. R.. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: A complex story. **Molecular and Celular Endocrinology**, 250, p.70-79, 2006.

EDDY, E. M.; O'BRIEN, D. A.. The spermatozoon In **The Physiology of Reproduction (E. Knobil and J. Neill)**, 2<sup>o</sup> edition, p.29–77. Raven Press, New York. 1994.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B.. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, julho, 46, p.265-271, 2000.

FUNAHASHI, H.. Induction of capacitation and the acrosome reaction of boar spermatozoa by L-arginine and nitric oxide synthesis associated with the anion transport system. **Reproduction**, 124, p.857–864, 2002.

GONCALVES, P. B. D. et al. Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 31, p.212-217, 2007.

GONÇALVES, P. B. D. et al. Produção in vitro de embriões. In: **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 1<sup>a</sup> ed., São Paulo: Gonçalves, P. B. D; Figueiredo, J. R. & Freitas, V. J. F., p.195-196, 2002.

GUTIÉRREZ-ADÁM, A. et al. Effect of the in vitro culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, 55, p.1117-1126, 2001.

HAFEZ, E.S.E & HAFEZ, B.. **Reprodução animal**. 7.ed. Barueri: Manole, 509p, 2004.

HARDY, D. M.. **Fertilization**. Academic Press, San Diego, 2002.

HELLSTROM, W. J.. et al. Effect of sodium nitroprusside on sperm motility, viability and lipid peroxidation. **Fertility and Sterility**. 61, p.1117–1122, 1994.

HERRERO, M. B. et al. Effect of nitric oxide on mouse sperm hyperactivation. **Acta Physiology Pharmacology Ther Latinoan**, 44, p.65-69, 1994.

HERRERO, M. B.; GAGNON, C.. Nitric oxide: a novel mediator of sperm function. **Journal of Andrology**, 22, p.349-396, 2001.

HOU, M. L. et al. Geldanamycin augments nitric oxide production and promotes capacitation in boar spermatozoa *Animal Reproduction Science*, 104, Issue 1, 1, p.56-68, 2008.

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

JOHNSON, M. H.; NASR-ESFAHANI, M. H. Radical Solutions and Cultural Problems: Could Free Oxygen Radicals Be Responsible for the Impaired Development of Preimplantation Mammalian Embryos In Vitro? *Bioessays*. 16, p. 31-38, 1994.

LAMIRANDE, E.; O'FLAHERTY, C.. Sperm activation: Role of reactive oxygen species and kinases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, 1784, p.106-115, 2008.

LEAL, A.C.M.S. et al. Role of nitric oxide on quality of freshly ejaculated bull spermatozoa during heparin-induced in vitro capacitation. *Animal Reproduction Science*, 2009.

LEHNINGER, A. L.. **Princípios de bioquímica**. Ed. Savier, São Paulo, 1991.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *Journal of Biology and Chemistry*, 268, p.12231-12234, 1993.

MEIRELLES, F. V. et al. Genome activation and developmental block in bovine embryos. *Animal Reproduction Science*, 82-83, p.13-20, 2004.

MENDES JR., J. O. B. et al. Effect of heparin on cleavage rates and embryo production with four bovine sperm preparation protocols. *Theriogenology*, 60, p.331-340., 2003.

MONACO, E. et al. Effect of osteopontin (OPN) on in vitro embryo development in cattle. *Theriogenology*, 71, p.450-457, 2008.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A.. The L-arginine-nitric oxide pathway. *New England Journal Medicine*, 329, p.2002-2012, 1993.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J.. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine*, 31, n.11, p.1287-1312, 2001.

NOVAES, M. R. C. G.; BEAL, F. L. R.. Pharmacology of L-arginine in cancer patients **Revista Brasileira de Cancerologia**, 50, p.321-325, 2004.

O'BRYAN, M. K et al. Human sperm endothelial nitric oxide syntase expression: correlation with sperm motility. **Fertility and Sterility**, 70, p.1143-1147, 1998.

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

O'FLAHERTY, C. M.; BEORLEGUI, N. B.; BECONI, M. T.. Acrosome reaction in bovine spermatozoa: Role of reactive oxygen species and lactate dehydrogenase C4. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1726, p.96-101, 2005.

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

O'FLAHERTY, C. M.; RODRIGUEZ, P.; SRIVASTAVA, S.. L-Arginine promotes capacitation and acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1674, p.215-221, 2004.

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

PARRISH, J. J. et al. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology of Reproduction**, 38, p.1171-1180, 1988.

PEREZ, L. J. et al. *In vitro* capacitation and induction of acrosomal exocytosis in ram spermatozoa as assessed by the chlortetracycline assay. **Theriogenology**, 45, p.1037-1046, 1996.

REVELLI, A. et al. Signaling pathway of nitric oxide-induced acrosome reaction in human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, 64, p.1708-1712, 2001.

RICART-JANE, D.; LOBERA, M.; LOPEZ-TEJERO, M. D.. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess method. **Nitric Oxide**, 6, p.178-185, 2002.

RIZOS, D. et al. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization on early embryo Development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, 61, p.234-248, 2002.

RODRIGUES, J. L.. Perspectivas da biotecnologia na reprodução animal. **A hora veterinária**, 97, p.52-57, 1997.

RODRIGUEZ, P. C. et al. Nitric oxide-induced capacitation of cryopreserved bull spermatozoa and assessment of participating regulatory pathways. **Animal Reproduction Science**, 85, p.231-242, 2005.

ROY, S. C.; ATREJA, S. K.. Tyrosine phosphorylation of a 38-kDa capacitation-associated buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm protein is induced by L-arginine and regulated through a cAMP/PKA-independent pathway. *Int. Journal Andrology*, 31, p.12-24, 2008.

SATRIANO, J. Arginine pathways and the inflammatory response: Interregulation of nitric oxide and polyamines: Review article. **Amino Acids, Wien**, 26, p.321-329, 2004.

SAUVÉ, R.. Ultrasound guided follicular aspiration and in vitro fertilization. **Arquivo da Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre**, 26, p.141-155, 1998.

SCMIDT, H.H.H.W., WALTER U.. NO at work. **Cell**, 78, p.919-925, 1994.

SILVEIRA, L.R. Critical and methodological analyses on the determination of reactive species in skeletal muscle cells during contractions. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica**, 48, São Paulo, Dezembro, 2004.

SLATER, A. F. G. et al. Intracellular Redox Changes during Apoptosis. **Cell Death Different**, 3, p.57-62, 1996.

SRIVASTAVA, S. et al. Mechanism of Action of L-arginine on the Vitality of Spermatozoa is Primarily Through Increased Biosynthesis of Nitric Oxide. **Biology of Reproduction**, 74, p.954-958, 2006.

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

TAMASSIA, L. F. M.. E a reprodução animal, como fica? **Noticiário Tortuga**, São Paulo, Ano 52, 453, p.41, setembro/outubro, 2007.

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

TESFAYE, D. et al. Effect of Nitric Oxide Inhibition and Temporal Expression Patterns of the mRNA and Protein Products of Nitric Oxide Synthase Genes During In Vitro Development of Bovine Pre-implantation Embryos. **Reproduction Domestic Animal**, 41, p.501-509, 2006.

VAN DE VELDE, H. et al. Embryo implantaio after biopsy o fone or two cells from cleavage-stage embryos with a view to preimplantation genetic diagnosis. **Prenatal Diagnosis**, 20, p.1030-1037, 2000.

VIANA, J. H. M.. Um panorama da TE no mundo. **Jornal O Embrião**, 18, 2004.

VIANA, J. H. M.. Mudanças e tendências no mercado de embriões bovinos no Brasil. **Jornal O Embrião**, 42 (julho/agosto), 2009.

VIGGIANO, J. M. et al. Analysis of the effect of nitric oxide synthase inhibition on mouse sperm employing a modified staining method for assessment of the acrosome reaction. **Journal of Andrology**, 17, p.692-698, 1996.

VISCONTI, P. E. et al. Colesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. **Development Biology**, 214, p.429-443, 1999.

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

YANAGIMACHI, R.. Mammalian fertilization. In **The Physiology of Reproduction** (E. Knobil and J. Neill,) 2º edition, p.189-317. Raven Press, New York, 1994.