

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO – UNIFENAS
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL
LAÍLA PEREIRA DA SILVA

TEOFILINA ASSOCIADA OU NÃO À HEPARINA COMO AGENTE
CAPACITANTE PARA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

Alfenas – MG

2015

LAÍLA PEREIRA DA SILVA

TEOFILINA ASSOCIADA OU NÃO À HEPARINA COMO AGENTE
CAPACITANTE PARA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

Dissertação apresentada à Universidade José do Rosário
Vellano como parte das exigências do Mestrado em Ciência
Animal para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.(a) Dra. Fabiana Cristina Varago

Alfenas – MG

2015

Silva, Laíla Pereira da
Teofilina associada ou não à heparina como agente
capacitante para produção *in vitro* de embriões bovinos/.— Laíla
Pereira da Silva, 2015.

56 f.

Orientadora: Prof^a. Dra. Fabiana Cristina Varago

Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-graduação
em Ciência Animal- Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas,
2015.

1. Fertilização 2. Reação acrossômica 3. Capacitação 4.
Espermatozoides 5. Metilxantinas I. Universidade José do Rosário
Vellano II. Título

CDU: 636.082.4(043)



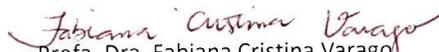
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

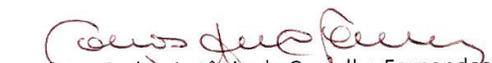
Título: "TEOFILINA ASSOCIADA OU NÃO A HEPARINA COMO AGENTE CAPACITANTE PARA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS".

Autor: Laíla Pereira da Silva

Orientador: Profa. Dra. Fabiana Cristina Varago

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM CIÊNCIA ANIMAL** pela Comissão Examinadora.


Profa. Dra. Fabiana Cristina Varago
Orientadora


Prof. Dr. Carlos Antônio de Carvalho Fernandes


Prof. Dr. José Antonio Dias Garcia

Alfenas, 27 de fevereiro de 2015.


Prof. Dr. Mário Sérgio Oliveira Swerts
Diretor de Pesquisa e Pós-graduação
UNIFENAS

Dedico essa conquista aos meus queridos pais, que nunca mediram esforços para a realização dos meus objetivos. Minha gratificação é ver o orgulho no olhar deles e fazê-los feliz.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e por me guiar em todos os momentos.

Aos meus pais Dercílio Pereira da Silva e Cleusa Vilma da Silva, pelo incentivo, apoio, compreensão e dedicação, se sacrificando para que meus sonhos se tornassem realidade. Pelas inúmeras noites sem sono preocupando com meus problemas e minha segurança. E por todo amor e confiança em mim depositados.

Aos meus irmãos e a toda minha família, pelas palavras de carinho, pelo incentivo e por todo apoio e confiança.

À Dra. Fabiana Cristina Varago, pessoa de bondade inigualável, pelos ensinamentos, por ter contribuído para meu crescimento profissional e pessoal, pela confiança em mim depositada, por todas as oportunidades, por acreditar em mim mais do que eu mesma, pelos conselhos, enfim, por tudo, por ter sido mais que uma orientadora, uma amiga, uma mãe, uma irmã.

À Josiane Rossi Ribeiro por toda ajuda, apoio, dedicação, companheirismo e amizade, para que esse trabalho fosse concretizado com muito sucesso. Obrigada por tudo!

Ao Vinícius Araújo Swerts por todo apoio, incentivo, companheirismo, pelas inúmeras vezes em que foi meu confidente e me auxiliou a superar os obstáculos e por também sempre acreditar na minha capacidade.

Aos bolsistas de iniciação científica, pelo apoio, esforço e pela grande contribuição para a realização deste trabalho.

À Thaísia Andriele Silva pela amizade.

Ao Sr. Eugênio Swerts e a Sra. Olinda Swerts pelo incentivo e por tantas vezes serem o meu refúgio diante de vários acontecimentos no decorrer desta trajetória.

Ao Dr. Carlos Antônio de Carvalho Fernandes, a Empresa Biotran e aos seus funcionários pela receptividade e pelo apoio estrutural por ceder o Laboratório de Produção de Embriões para a realização desta pesquisa.

À FAPEMIG e a Capes pelo apoio financeiro.

À Universidade José do Rosário Vellano e aos professores do Mestrado em Ciência Animal pelo apoio.

RESUMO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos, apesar de já utilizada em escala comercial, apresenta elevada variabilidade em seus resultados, que pode frequentemente ser atribuída à etapa de fertilização. Sendo assim, torna-se importante o estudo dos fatores relacionados ao sêmen, como o processo de capacitação espermática. O objetivo do estudo foi avaliar a teofilina como agente de capacitação substituto ou associado à heparina no desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro* e sobre a reação acrossômica das células espermáticas. O experimento foi realizado com 4 touros e 3 tratamentos, totalizando 12 grupos experimentais. Cada touro foi avaliado em cada tratamento descrito a seguir: Tratamento 1 (T1): Heparina - 10µg/mL; Tratamento 2 (T2): Teofilina – 5 mM; Tratamento 3 (T3): Heparina (10µg/mL) + Teofilina (5mM). O sêmen dos touros foi descongelado e submetido à incubação com os três tratamentos por 0, 6, 12 e 18h, posteriormente corados com *Trypan blue*/ Giemsa e analisados em microscopia eletrônica para avaliação da reação acrossômica. Para a PIVE os agentes de capacitação adicionados aos meios de fertilização foram testados utilizando os mesmos touros. Na análise espermática a taxa de reação acrossômica verdadeira foi maior ($p<0,05$) no tempo 0h enquanto para os espermatozoides mortos foi observada maior taxa ($p<0,05$) nos tempos de 12h ($84,46 \pm 5,82$) e 18h ($86,75 \pm 4,19$). A taxa de embriões produzidos na PIVE ($37,97 \pm 13$) e a taxa de eclosão ($33,50 \pm 14$) foram maiores ($p<0,05$) para o tratamento heparina. Não houve influência de touro ou de tratamentos ($p>0,05$) na análise de reação acrossômica. A utilização da teofilina como agente de capacitação reduziu as taxas de produção embrionária na fertilização *in vitro*, no entanto foi tão eficiente quanto à heparina na indução da reação do acrossoma.

Palavras-chave: Fertilização, Reação acrossômica, Capacitação, Espermatozoides, Metilxantinas.

ABSTRACT

The in vitro production (IVP) of bovine embryos despite already used on a commercial scale, presents high variability in the results, that can often be attributed to the fertilization step. Therefore, it is important to research factors related to semen, such as sperm capacitation process. The aim of the study was to evaluate theophylline or its combination with heparin as possible replacement capacitation agent in the development of in vitro produced embryos and in acrosome reaction of sperm cells. The experiment was carried out with 4 bulls and 3 treatments, with 12 experimental groups. Each bull was evaluated in all treatments as described below: Treatment 1 (T1): Heparin - 10mg / ml; Treatment 2 (T2): Theophylline - 5 mM; Treatment 3 (T3): Heparin (10 mg / ml) + theophylline (5mM). The bulls semen was thawed and exposed to incubation in three treatments for 0, 6, 12 and 18h, subsequently stained with Trypan blue / Giemsa and analyzed by electron microscopy for assessment of the acrosome reaction. For IVP of embryos capacitation agents added to fertilization medium were evaluated utilizing the same bulls. In sperm analysis, real acrosome reaction rate was higher ($p < 0,05$) at 0h time while the higher dead spermatozoa rate ($p < 0,05$) was observed at 12 h ($84,46 \pm 5,82$) and 18h ($86,75 \pm 4,19$). The IVP embryos rate ($37,97 \pm 13$) and the hatching rate ($33,50 \pm 14$) were higher ($p < 0,05$) in heparin treatment. There was no influence of bull or treatments ($p > 0.05$) in the acrosome reaction analysis. The use of theophylline as a capacitation agent decreased embryo production rates in IVF, however was as efficient as heparin in acrosome reaction induction.

Keywords: Fertilization, Acrosome reaction, Capacitation, Sperm, Methylxanthines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de eventos intracelulares durante a capacitação dos espermatozoides bovinos por heparina.....	19
Figura 2. Esquema da produção in vitro de embriões e as taxas avaliadas.....	55
Figura 3. Espermatozoides após coloração <i>Trypan blue/</i> Giemsa.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação espermática relativa à ocorrência de reação acrossômica após coloração dupla <i>Trypan blue</i> / Giemsa em função do tratamento.	38
Tabela 2. Classificação espermática relativa à ocorrência de reação acrossômica após coloração dupla <i>Trypan blue</i> / Giemsa em função do tempo.	38
Tabela 3. Taxas de clivagem, produção embrionária e eclosão em função de tratamento.	39
Tabela 4. Taxas de clivagem, produção embrionária e eclosão em função de touro.	39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Estrutura da célula espermática.....	13
2.2 Composição do líquido tubário.....	14
2.3 Capacitação espermática.....	14
2.3.1 Principais fatores desencadeadores da capacitação.....	16
2.3.1.1 Bicarbonato.....	16
2.3.1.2 Albumina.....	17
2.3.1.3 Íons Cálcio.....	17
2.3.1.4 Glicosaminoglicanos.....	18
2.3.1.5 Metilxantinas.....	20
2.3.2 Eventos que ocorrem no espermatozoide durante a capacitação.....	22
2.3.2.1 Mudanças nos sistemas adenilatociclase-AMPC.....	22
2.3.2.2 Mudanças na membrana plasmática.....	23
2.4 Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE).....	24
2.4.1 Fertilização <i>in vitro</i> (FIV).....	24
2.5 Efeito touro.....	26
REFERÊNCIAS.....	27
CAPÍTULO 1 – Biology of Reproduction – Qualis A1 – Situação: A ser submetido.....	33
ANEXO – NORMAS DE PUBLICAÇÃO.....	46
APÊNDICE I – MATERIAL E MÉTODOS.....	50
APÊNDICE II.....	56

1 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) de mamíferos de interesse econômico, através das técnicas de maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV), é uma importante biotécnica associada ao aumento da produtividade. Na espécie bovina há grande necessidade por animais geneticamente superiores. Assim, a técnica de PIVE tem sido muito utilizada para obter o máximo do potencial reprodutivo dos rebanhos, reduzindo o intervalo entre as gerações e promovendo um aumento do melhoramento genético animal (VARAGO, MENDONÇA, LAGARES, 2008).

Atualmente, com a aplicação em larga escala desta tecnologia, pode-se conseguir entre 50 a 100 descendentes de uma fêmea geneticamente superior, num período de um ano (VARAGO, MENDONÇA, LAGARES, 2008). Embora com grande potencial para contribuir com o melhoramento genético da bovinocultura do Brasil, a PIVE ainda encontra uma série de limitações para que seja empregada em maior frequência e com melhores resultados. A elevada variabilidade associada às taxas de fertilização e clivagem, possivelmente oriunda do fator touro é uma delas. Aparentemente este fato é mais evidente quando se usa touros zebuínos para a fertilização. Neste sentido, torna-se importante o estudo dos fatores relacionados ao sêmen, assim como o processo de capacitação espermática.

Por ser imprescindível para que ocorra a fertilização, a capacitação deve receber especial atenção durante a PIVE, uma vez que este processo ocorre de forma fisiológica durante a passagem dos espermatozoides pelo trato genital da fêmea (GORDON, 1994). A capacitação espermática é constituída de mudanças bioquímicas e fisiológicas no espermatozoide, que o tornam apto a sofrer a reação acrossômica e assim penetrar na zona pelúcida do oócito maturado. Estas mudanças durante a capacitação também promovem a hiperativação do espermatozoide aumentando a sua motilidade (CARVALHO, FERREIRA, SILVEIRA, 2002).

Neste sentido, o objetivo do estudo foi testar a teofilina como agente capacitante substituto ou associado à heparina no desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro* e sobre a reação acrossômica das células espermáticas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estrutura da célula espermática

Os espermatozoides são células alongadas, haplóides, constituídos de uma cabeça achatada com um núcleo e uma cauda recoberta por membrana plasmática (ALBERTS *et al.*, 1997).

A cabeça do espermatozoide é formada pelo núcleo celular e pode ser dividida em duas partes: acrossomal e pós-acrossomal. O acrossoma é formado pelo complexo de Golgi durante a fase de espermiogênese e é composto por dupla camada de membrana que envolve a parte anterior do núcleo. A capa do acrossoma, também conhecido por capuchão, contém glicoproteínas e enzimas como a proacrosina e a hialuronidase que são responsáveis pela penetração do espermatozoide no oócito (BARTH e OKO, 1989). O segmento equatorial do acrossoma tem sua importância no momento da fecundação, quando juntamente com a região anterior pós-acrossomal se funde com a membrana do oócito. O núcleo contém cromatina condensada composta por ácido desoxirribonucleico (DNA), o qual forma um complexo com as protaminas espermáticas, classe especial de proteínas (GARNER e HAFEZ, 2004). A região pós-acrossomal é composta pelo plasmalema, onde se encontra a parte posterior do núcleo e os microtúbulos, dando formação a fossa de implantação onde a cauda é inserida (BARTH e OKO, 1989).

A cauda do espermatozoide é dividida em quatro partes bem distintas: colo, peça intermediária, peça principal e peça terminal. O colo fica entre a peça intermediária e a cabeça. É uma curta porção com a função de ligar essas duas estruturas. Formada por uma região articular chamada de *capitulum*, que é fixada pela membrana basal do núcleo por delicados filamentos (SETCHELL, 1993).

No centro da cauda encontra-se o axonema central, composto por centríolos arranjados em pares de microtúbulos dispostos ao redor de dois filamentos centrais e circundados por fibras densas. O axonema e as fibras estão associadas à peça intermediária, sendo recobertos por uma camada de mitocôndrias, as quais são responsáveis pelo fornecimento de energia a partir da produção de ATP (adenosina trifosfato) e pela motilidade dos espermatozoides (BARTH e OKO, 1989; GARNER e HAFEZ, 2004).

A peça principal se estende até a parte terminal da cauda, e é composta do axonema recoberto por uma bainha fibrosa, estrutura do citoesqueleto que rodeia o axonema e as fibras densas externas, formando um suporte no controle do movimento flagelar por estabilidade dos

elementos contráteis da cauda. E a peça terminal contém o axonema responsável pela motilidade espermática (GARNER e HAFEZ, 2004).

A membrana plasmática dos espermatozoides envolve toda a célula, a fim de manter todos os componentes juntos, além de manter um gradiente químico adequado de íons e outros componentes, devido a suas características semipermeáveis. A membrana abrange cinco domínios específicos: o acrossoma, segmento equatorial, segmento basal, região intermediária e cauda (SILVA e GADELLA, 2006). Existe alta proporção de proteínas e lipídeos na membrana espermática, sendo os lipídeos compostos em sua maioria por glicolipídeos e fosfolipídeos, assim como o colesterol. O colesterol exerce um papel limitador da permeabilidade de íons e da fluidez da bicamada lipídica, além de estabilizar a membrana prevenindo processos envolvidos na capacitação. Dessa forma, a redistribuição do colesterol causa a desestabilização das membranas induzindo assim, a capacitação (DE LAMIRANDE, LECLERC, GAGNON, 1997). De acordo com Yanagimachi (1994), o colesterol é o componente que mais varia na composição da membrana espermática e está relacionado com a taxa de capacitação, além de serem encontradas grandes quantidades desse lipídeo no plasma seminal durante esse processo.

2.2 Composição do líquido tubário

Durante a fecundação, os gametas encontram-se no líquido tubário intraluminal. Esse líquido é formado por uma secreção específica do epitélio e por transudação seletiva do sangue por meio da lâmina própria, constituindo diferenças regionais na composição, as quais podem ter relação no processo de preparação dos gametas (LEESE *et al.*, 2001). O líquido tubário intraluminal é diferente do plasma do sangue em relação à composição iônica, pH, osmolaridade e teor de macromoléculas. O pH é ligeiramente alcalino e os níveis de bicarbonato variam entre 35-90 mM, mais elevado do que no sangue venoso, além de ser rico em proteínas (LEESE, 1988; HUGENTOBLE *et al.*, 2004; ZHOU; WANG; CHAN, 2005).

O líquido tubário contém glicosaminoglicanos (GAGs) não-sulfatados como o ácido hialurônico ou sulfatados (S-GAGs) como sulfato de condroitina, sulfato de dermatan, sulfato de queratina, sulfato de heparan e heparina (Rev. por RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007).

2.3 Capacitação espermática

No epidídimo, o espermatozoide adquire capacidade para fecundar a partir de mudanças relacionadas à motilidade, morfologia e ao metabolismo. São várias as modificações bioquímicas ocorridas com o espermatozoide, dentre elas, ocorre a estabilização da cromatina, das estruturas da cauda e da cabeça, aquisição do movimento progressivo e habilidade para ligar-se à zona pelúcida, reorganização e estabilização da membrana plasmática pela absorção e/ou integração de glicoproteínas do epidídimo. Quando em contato com o plasma seminal, os espermatozoides sofrem alterações e inclusões de diversas substâncias na sua superfície, tornando-os impossibilitados de fecundar. A este fenômeno, dá-se o nome de decapacitação espermática (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

Decorrido a ejaculação, os espermatozoides adquirem intensa motilidade e no trato genital feminino ou *in vitro*, iniciam a capacitação, fase final de maturação pós-testicular. O processo da capacitação espermática ocorre para que os espermatozoides se tornem capazes de se ligarem aos receptores específicos na zona pelúcida do oócito e o fecundarem. No trato genital feminino, a capacitação ocorre pela remoção dos componentes decapacitantes, por modificações bioquímicas, havendo a desestabilização (fluidez) da membrana plasmática e hiperativação das células espermáticas, de fundamental importância para que haja a reação do acrossomo e a penetração no oócito. Os espermatozoides se ligam ao epitélio da tuba uterina e soltam-se depois da capacitação, quando se tornam hiperativos e aptos à reação do acrossoma (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

Fisiologicamente, a tuba uterina fornece um adequado ambiente para o transporte, armazenamento e capacitação dos espermatozoides, colheita, transporte e maturação dos oócitos, fertilização e cultivo embrionário (HUNTER e RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2004). Além de fornecer um ambiente seguro no qual os espermatozoides inseminados possam sobreviver ao longo de um período de horas, já que são células totalmente diferenciadas, sem capacidade de reparação, se forem danificados (RODRIGUEZ-MARTINEZ *et al.*, 2001; RODRIGUEZ-MARTINEZ *et al.*, 2005).

A desestabilização da membrana plasmática do espermatozoide durante a capacitação pode levar a morte celular, caso o espermatozoide não esteja próximo a um oócito. Deste modo, *in vivo*, os componentes da tuba devem favorecer a desestabilização da membrana seletiva para preparar a célula espermática para a interação dos gametas, mantendo assim, as propriedades necessárias do espermatozoide para a fecundação até o momento da ovulação. Acredita-se que esta modulação não seja uma característica do espermatozoide, mas sim um controle exato da tuba uterina (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007).

In vivo a capacitação é ativa e progressiva de acordo com as regiões do trato genital feminino e pode estar relacionada à ovulação. A principal diferença nos procedimentos *in vitro* é que a maioria dos espermatozoides capacita de uma só vez (HARRISON e GADELLA, 2005).

A capacitação *in vitro* deve basear-se nas características do fluido presente na tuba. Portanto, é necessária a presença de substratos energéticos como: piruvato, lactato, glicose, um captador de colesterol (geralmente a albumina sérica), cálcio (Ca^{++}), concentrações baixas de potássio (K^+) e fisiológicas de sódio (Na^+). *In vitro*, este processo geralmente é observado na presença do tampão NaHCO_3 (bicarbonato de sódio) e está associado a mudanças no metabolismo de Adenosina 3',5'-Monofosfato cíclico (AMPC) e fosforilação da proteína tirosina e a mudanças estruturais da membrana relacionadas principalmente ao transporte de íons cálcio (VISCONTI *et al.*, 1999; ASSUMPÇÃO *et al.*, 2002). Portanto, acredita-se que substâncias que induzam essas mudanças desempenhariam um papel de desencadeadores do processo de capacitação espermática (ASSUMPÇÃO *et al.*, 2002).

2.3.1 Principais fatores desencadeadores da capacitação

2.3.1.1 Bicarbonato

De acordo com Litvin *et al.* (2003) o componente que mais parece ser responsável por induzir a capacitação é o bicarbonato, que age sobre a adenilato ciclase solúvel (ACS) presente no sêmen, promovendo a ativação desta enzima.

Como desencadeador da capacitação, o bicarbonato ativa uma ACS espermatozoide específica que se liga a proteína kinase A (PKA), que por sua vez, via fosforilação proteica da tirosina, direta ou indiretamente, ativa o deslocamento dos fosfolípidos da membrana, levando a alteração da mesma e promovendo a capacitação das células espermáticas (FLESCH e GADELLA, 2000).

O deslocamento dos fosfolípidos é dose dependente dos níveis de bicarbonato, podendo se movimentar na ausência de bicarbonato quando houver inibidores da fosfodiesterase, os quais inibem a quebra do AMPC, que ativa a PKA (FLESCH e GADELLA, 2000).

Na cauda do epidídimo, onde ficam armazenados os espermatozoides, a concentração de bicarbonato é baixa (<1 mM). No trato genital feminino, há concentrações superiores, cerca de 15 mM. Os níveis intracelulares de bicarbonato podem aumentar pela sua entrada na

célula pelos canais iônicos ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$) da membrana plasmática (FLESCH e GADELLA, 2000).

A resposta rápida (± 10 min) do bicarbonato envolve a via de sinalização ACS – AMPc – PKA (HARRISON e MILLER, 2000). Já uma resposta em longo prazo (± 1 h) é pela ativação da tirosina kinase (TK), na qual proteínas quinases de ancoragem se ligam as subunidades da PKA e se tornam tirosina fosforilada durante a capacitação espermática. Desse modo, formam moléculas de sinalização da via ACS – AMPc – PKA e da via da TK (GADELLA e VAN GESTEL, 2004).

2.3.1.2 Albumina

A albumina, além de ter função nutricional, é responsável pela remoção do colesterol da membrana plasmática do espermatozoide, causando alterações na sua fluidez e uma diminuição da relação colesterol/ fosfolípídeo (CROSS, 1998). Esta extração do colesterol ocorre em áreas restritas da membrana, havendo um deslocamento dos fosfolípídeos, que acarreta no rearranjo de sua estrutura (YANAGIMACHI, 1994).

O tempo para capacitação varia de acordo com as espécies. Em espermatozoides bovinos, os quais a membrana plasmática é rica em colesterol, é verificada a necessidade de maior tempo de capacitação (FLESCH e GADELLA, 2000).

2.3.1.3 Íons Cálcio

Com importante papel nos processos de capacitação, o cálcio intracelular influencia a hiperatividade e a reação acrossomal para a fertilização. Além de ser o principal elemento para a motilidade do flagelo e fusão da vesícula acrossomal. O aumento dos níveis de cálcio interno é essencial para a sinalização da ZP_3 (uma das três glicoproteínas da zona pelúcida e espécie-específica), induzindo à ocorrência da reação do acrossoma (DARSZON *et al.*, 1999).

A penetração do espermatozoide, no momento da fertilização, induz alterações nos níveis de cálcio intracelular no oócito. Dessa forma, os íons cálcio estão envolvidos na exocitose dos grânulos corticais, a fim de modificar os receptores da zona pelúcida, levando ao bloqueio da polispermia e controlam a clivagem do embrião (ALBERTS *et al.*, 2002).

Se ocorrer a polispermia, são formados fusos extras e multipolares, geralmente, cessando o desenvolvimento embrionário. São dois os mecanismos de bloqueio no oócito para assegurar a monospermia. O primeiro ocorre na fusão do primeiro espermatozoide, pela

despolarização da membrana plasmática oocitária, evitando temporariamente a penetração de outros. O segundo mecanismo de bloqueio, ocorre com a extrusão dos grânulos corticais, compondo um evento permanente causado pela elevação do cálcio intracelular no momento da penetração do espermatozoide (ALBERTS *et al.*, 2002).

2.3.1.4 Glicosaminoglicanos

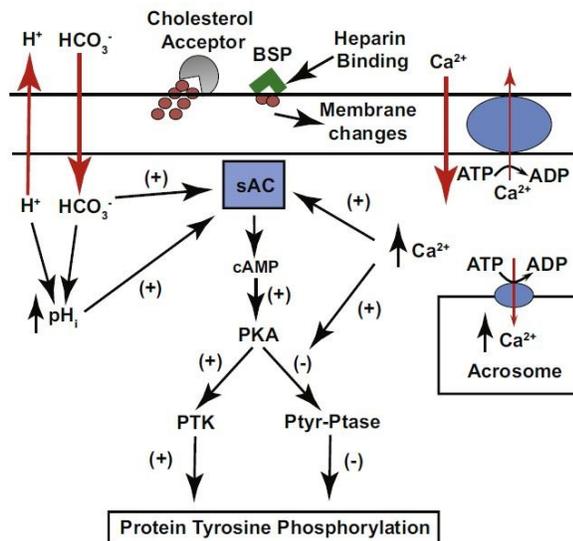
Em condições naturais, o processo de capacitação parece ocorrer na junção útero-tubárica por um mecanismo não totalmente esclarecido, porém envolve a ação de glicoproteínas secretadas na tuba uterina, chamadas de glicosaminoglicanos, como a heparina e os sulfatos de heparan, condroitina e queratina (GORDON, 1994; HAFEZ e HAFEZ, 2004). A descoberta dos glicosaminoglicanos proporcionou o desenvolvimento de técnicas para induzir a capacitação *in vitro* e, conseqüentemente a melhora nos resultados de fecundação *in vitro*.

Os glicosaminoglicanos (GAGs) estão presentes nos líquidos foliculares e em secreções da tuba uterina. Após exposição a estes compostos os espermatozoides são capazes de sofrer a reação acrossômica (BALL *et al.*, 1983; LENZ *et al.*, 1983).

Os GAGs residem em células epiteliais da tuba uterina como proteoglicanos, e interagem com o espermatozoide após a sua ligação a estas células *in vivo* (PARRISH *et al.*, 1989a).

Dentre os vários métodos testados para indução da capacitação de espermatozoides bovinos para fins de fecundação *in vitro*, o que se mostrou mais eficiente foi a utilização da heparina, um glicosaminoglicano presente em elevadas concentrações no trato reprodutivo de fêmeas bovinas, principalmente durante o estro (GORDON, 1994). A heparina promove a capacitação do espermatozoide ao se ligar e induzir alterações nas proteínas da membrana plasmática, ativando canais iônicos, aumentando o cálcio intracitoplasmático e, conseqüentemente o pH (BAVISTER, 2002), como observado na Figura 1.

Figura 1. Modelo de eventos intracelulares durante a capacitação dos espermatozoides bovinos por heparina.



Fonte: PARRISH, 2014.

A ligação da heparina com o espermatozoide é saturável (receptor com pontes de ligação), reversível, dependente do pH, temperatura e nível de cálcio. O seu efeito pode variar com a dose utilizada, concentração e peso molecular das proteínas ligadoras de heparina (HBPs) presentes nos espermatozoides (Parrish *et al.*, 1988).

Parrish *et al.* (1988) observaram que a heparina induz a capacitação de espermatozoides bovinos em vez da reação acrossômica. A ligação da heparina se dá por uma série de proteínas do plasma seminal bovino, que se ligam ao espermatozoide na ejaculação, e interagem com o colesterol e os fosfolípidos da membrana plasmática. Após a ligação à heparina, há perda de componentes da superfície do espermatozoide, incluindo a lecitina, proteínas do plasma seminal, colesterol e fosfolípidos (MANJUNATH e THERIEN, 2002). Outras alterações estão relacionadas à ligação a heparina na célula espermática, como alterações de pH intracelular, de cálcio intracelular e os níveis de AMPc (PARRISH, 2014).

Foram observadas interações entre heparina e glicose na capacitação espermática pela primeira vez por Parrish, Susko-Parrish, First (1985). A quebra da glicose ou outros compostos semelhantes leva a acidificação do espermatozoide bovino que bloqueia a capacitação induzida pela heparina. O principal efeito é que a glicólise acidifica o pH do sêmen, o que se opõe a alcalinização induzida por heparina. O efeito da glicose pode ser contornado pela adição de compostos que aumentam o AMPc intracelular, como 8-bromo-

AMPC, isobutilmetilxantina e cafeína, ou permitindo tempo suficiente para o espermatozoide metabolizar toda a glicose presente (PARRISH, SUSKO-PARRISH, FIRST, 1989).

O cálcio também está relacionado à heparina, que induz a entrada de cálcio na célula espermática, sendo fundamental para a capacitação durante as primeiras 2 horas de exposição à heparina. Durante esse tempo o acrossoma acumula cálcio e impede o aumento de Ca^{++} no citoplasma. Com o acúmulo no acrossoma, o Ca^{++} aumenta e se um espermatozoide não entrar em contato com o estímulo adequado, que seria a zona pelúcida, ocorre uma reação acrossômica espontânea e conseqüentemente a morte do espermatozoide. O aumento definitivo do cálcio é importante e está relacionado com a capacidade fisiológica do acrossoma reagir (PARRISH, SUSKO-PARRISH, GRAHAM, 1999).

No mínimo 10 mmol/L de bicarbonato são necessários no meio de fertilização para que ocorra a capacitação induzida por heparina. O espermatozoide contém uma ACS presente no citoplasma que é estimulada por bicarbonato. Além do aumento de AMPC nos espermatozoides durante a capacitação, provavelmente, não ocorra na ausência de bicarbonato (PARRISH *et al.*, 1989b).

2.3.1.5 Metilxantinas

As metilxantinas abrangem um grupo de substâncias alcalóides presentes na natureza, particularmente no chá, café e cacau (PAUWELS *et al.*, 2001).

Os mecanismos de ação celular das metilxantinas são principalmente a inibição da fosfodiesterase (conseqüentemente, o aumento intracelular de AMPC), o desacoplamento do cálcio intracelular favorecendo elementos contráteis musculares e antagonizando receptores de adenosina, efeito na concentração de cálcio intracelular (direto e indireto por hiperpolarização da membrana celular) (PAUWELS *et al.*, 2001).

As metilxantinas mais conhecidas são a cafeína, teofilina e teobromina e menos conhecidas a aminofilina e a pentoxifilina. A teofilina foi identificada como um componente, encontrada no chá, por Fisher em 1888, que também estabeleceu sua estrutura molecular (FREDHOLM, 2011). A solubilidade das metilxantinas é muito baixa, o que torna obrigatória para uso farmacológico a formação de complexos com outras substâncias mais solúveis. O mais conhecido desses complexos ocorre entre a teofilina e a etilenodiamina, para que se forme a aminofilina (PAUWELS *et al.*, 2001).

A cafeína, como todas as metilxantinas, é um inibidor da fosfodiesterase, substância que permite o aumento da concentração do AMPC durante a capacitação espermática,

modulando a adenilciclase, induzindo a capacitação dos espermatozoides e a reação acrossômica, e melhora a penetração dos espermatozoides (NASCIMENTO, 2003). Estudos dos efeitos da cafeína em gametas masculinos mostraram uma estimulação da capacitação espermática e uma reação acrossômica espontânea (FUNAHASHI, 2005). Contudo, conforme se aumenta a concentração de cafeína, aumenta-se também a penetração oocitária pelos espermatozoides (FUNAHASHI e NAGAI, 2001). Em um estudo realizado por Curcio *et al.* (2010), quando comparado o grupo controle ($15,33 \pm 3,78$) em que o meio FIV foi suplementado com heparina, com o grupo suplementado com cafeína ($10,67 \pm 1,1$), demonstrou-se uma redução da taxa de clivagem quando adicionada cafeína ao meio de fertilização em volume utilizado convencionalmente nos protocolos de FIV.

Tajik e Niwa (1998) em seus estudos adicionando cafeína isoladamente ou associada a heparina em um meio com ou sem glicose, observaram que quando as condições do meio estão quimicamente definidas, a glicose é necessária para estimular a fertilização *in vitro* de oócitos bovinos e que a ação sinérgica da cafeína e heparina foi observada independente da atividade de inversão da cafeína sobre a inibição da capacitação por heparina induzida pela glicose.

A cafeína é a metilxantina mais utilizada na rotina dos laboratórios de PIV no mundo todo (NAGAI *et al.*, 1993; GORDON, 1994). No entanto, a teofilina, que possui mecanismo de ação semelhante à cafeína, porém, mais potente que a cafeína em aumentar os níveis intracitoplasmáticos de AMPc, tem sido pouco testada como agente capacitante do meio de FIV. Em poucos estudos encontrados na literatura foi constatada que a teofilina pode aumentar a capacidade dos espermatozoides em se ligar a oócitos maturados *in vitro* tanto na espécie bovina (TAKAHASHI e FIRST, 1993) quanto suína (YOSHIOKA *et al.*, 2003).

Segundo Yoshioka *et al.* (2003), a combinação de múltiplos agentes como a teofilina, a adenosina, e a cisteína no meio de FIV possibilitou a utilização dos espermatozoides de todos os varrões para fertilização na espécie suína e concluíram que a teofilina pode aumentar a capacidade fertilizante dos espermatozoides por mecanismos diferentes da cafeína. Na espécie bovina, Takahashi e First (1993) corroboram os achados em suínos, concluindo que a teofilina aumenta a capacidade dos espermatozoides fecundarem os oócitos e acelera o processo de fertilização *in vitro*. Ebner *et al.* (2011) em um estudo com homens portadores de azoospermia obstrutiva, avaliaram o uso da teofilina no sêmen descongelado e observaram uma melhora significativa na motilidade espermática quando foi utilizado a teofilina, além de maiores taxas de fertilização e blastocistos.

Estudos que comparam a utilização da teofilina em associação com a heparina na espécie bovina não foram encontrados na literatura. Contudo, Niwa e Ohgoda (1998) relataram que a incubação de espermatozoides na presença de heparina em combinação com cafeína melhorou a frequência de fertilização e diminuiu a diferença entre os touros, acreditando-se que tal combinação pode reduzir os efeitos individuais de touro.

A motilidade espermática é uma variável que reflete na vitalidade do ejaculado, e pode ser melhorada com a adição de estimulantes como a cafeína, a teofilina, a aminofilina e a pentoxifilina, no momento da diluição do sêmen, induzindo a capacitação e, conseqüentemente, a fecundação. Estes aditivos induzem alterações fisiológicas no espermatozoide, uma vez que a principal alteração é o aumento de AMPc intracelular, já que este nucleotídeo funciona como um mensageiro no interior da célula, responsável por ativar a proteína kinase. Esta, fosforila uma série de outras proteínas, desencadeando várias alterações fisiológicas, como ativação de enzimas, alteração de permeabilidade de membranas celulares, ativação de síntese proteica e aumento na secreção celular (DOMÍNGUEZ; GONZÁLEZ; ALEGRE, 2003; MAIA e BICUDO, 2009).

2.3.2 Eventos que ocorrem no espermatozoide durante a capacitação

Como outras células, os espermatozoides devem manter um gradiente iônico através da membrana plasmática. A concentração de íons potássio (K^+) dentro da célula é maior que fora dela, enquanto que o contrário ocorre com o íon sódio (Na^+). Este gradiente iônico é mantido por bombas de Na^+/K^+ ATPase dependente. A bomba Na^+/K^+ ATPase pode desempenhar um papel na capacitação induzindo a despolarização, já que a incubação de espermatozoides no meio de capacitação com baixos níveis de sódio inibem a capacitação. Este fenômeno pode ser explicado pelo requerimento de sódio intracelular para ativar os trocadores de Na^+/Ca^{++} , aumentando as concentrações de Ca^{++} intracelular (FLESCH e GADELLA, 2000).

Em relação ao metabolismo, relata-se que os espermatozoides exibem um aumento do metabolismo intracelular como, por exemplo, da atividade glicolítica e o consumo de oxigênio após a incubação no trato genital feminino ou em meio capaz de induzir a capacitação (YANAGIMACHI, 1994).

2.3.2.1 Mudanças nos sistemas adenilatociclase-AMPc

Na maioria das espécies, o espermatozoide começa a mover ativamente com o contato com o plasma seminal no momento da ejaculação. Entretanto, o espermatozoide destinado à fertilização pode temporariamente experimentar uma redução ou perda de sua motilidade, retomando esta movimentação de forma mais vigorosa ao final da capacitação (YANAGIMACHI, 1994). Este incremento na motilidade dos espermatozoides é denominada hiperativação. A ativação das proteínas quinase dependentes de AMPc e a fosforilação de proteínas espermáticas exercem papel vital no início e manutenção da motilidade espermática. Segundo Yanagimachi (1994), há evidências do aumento da atividade da adenilato ciclase durante a capacitação espermática. Aumentando a adenilato ciclase provavelmente aumenta o AMPc disponível, podendo estimular a proteína quinase dependente de AMPc, e esta, quando estimulada, pode alterar a estrutura das proteínas espermáticas da membrana e/ou de movimentação pela fosforilação.

2.3.2.2 Mudanças na membrana plasmática

Devido à membrana plasmática estar diretamente exposta ao ambiente de capacitação, não é de se surpreender que as mudanças mais significativas ocorram nela durante o processo. Foi postulado que a remoção ou alteração da “capa de cobertura” da superfície espermática constituía uma importante parte do processo de capacitação. Estes materiais de cobertura que são removidos ou alterados durante a capacitação incluem os fatores decapacitantes (YANAGIMACHI, 1994).

Mudanças na habilidade de ligação da lecitina à membrana plasmática durante a capacitação indicam que a metade das glicoproteínas periféricas ou integrais é alterada durante a capacitação, sendo atribuído este fato à remoção de terminais de ácido siálico das glicoproteínas da superfície dos espermatozoides (YANAGIMACHI, 1994).

Muita atenção tem sido direcionada ao colesterol da membrana plasmática devido a ele exercer vários papéis em todas as membranas biológicas como a passagem ativa ou passiva de íons pela membrana, regulando a orientação, fluidez e a espessura das membranas lipídicas. Acredita-se que a albumina e lipoproteínas do trato genital retiram o colesterol da membrana plasmática do espermatozoide (YANAGIMACHI, 1994; KOFT *et al.*, 1999).

Apesar da importância da remoção do colesterol da membrana plasmática para o processo de capacitação ter sido intensamente estudada, pode ser que a fase de separação dos fosfolípídeos de membrana e colesterol (migração lateral destas moléculas dentro da bicamada lipídica para formar os domínios), e não a remoção completa do colesterol da

membrana seja mais importante para a capacitação. Há relatos que a fluidez dos lipídeos da cabeça dos espermatozoides e da cauda da membrana plasmática altere-se como resultado da capacitação, sendo a movimentação do colesterol responsável em parte por tais mudanças (YANAGIMACHI, 1994; FLESCHE e GADELLA, 2000).

Alterações do glicocalix durante a capacitação podem ser verificadas por estudos de ligação a lecitina. Durante a capacitação, há reposição de glicolipídeos, liberação de fatores decapacitantes e de outros fatores. Foi postulado que a remoção de fatores decapacitantes induz a atividade da TK nas proteínas transmembrana, permitindo sua agregação posterior com a zona pelúcida (FLESCHE e GADELLA, 2000).

2.4 Produção *in vitro* de embriões (PIVE)

A técnica de PIVE se baseia na colheita dos oócitos que são maturados *in vitro* (MIV), fertilizados *in vitro* (FIV) e então os zigotos são cultivados *in vitro* (CIV). Todo este processo ocorre em laboratórios, dentro de incubadoras com temperatura e atmosfera controladas. Os embriões só são transferidos para as receptoras após seis ou sete dias de cultivo. É uma importante biotécnica utilizada para acelerar a produção de animais geneticamente superiores ou impedir o descarte precoce de fêmeas portadoras de alterações adquiridas (GONÇALVES, VISITIN, OLIVEIRA, 2002).

Embora aplicada em grande escala no Brasil, a técnica de PIV de embriões ainda apresenta limitações, sendo um dos principais problemas, os baixos resultados do desenvolvimento *in vitro* dos embriões, uma vez que, em média, 60 a 90% dos oócitos bovinos colocados para maturar são fertilizados e apenas 30 a 40% se desenvolvem até o estágio de blastocisto (GORDON, 1994; MOORE *et al.*, 2007; GONÇALVES *et al.*, 2007). Dessa forma, muitos estudos têm sido realizados para se aumentar a taxa de produção embrionária *in vitro*. Esses estudos baseiam-se principalmente na etapa da maturação dos oócitos e cultivo dos embriões, sendo que a etapa da fertilização *in vitro* tem recebido menor atenção por parte dos pesquisadores (ANCIOTO *et al.*, 2004; POZZOBON *et al.*, 2005; MIRANDA *et al.*, 2007).

2.4.1 Fertilização *in vitro* (FIV)

In vivo, para que ocorra a fertilização é necessário que o espermatozoide percorra um longo trajeto pelo trato genital da fêmea até chegar ao sítio de fertilização na tuba. Durante

este percurso, glicosaminoglicanos presentes no interior do trato reprodutivo feminino induzem sua capacitação (HAFEZ e HAFEZ, 2004). Para fertilização *in vitro*, a capacitação espermática é geralmente promovida pela heparina, um glicosaminoglicano presente em altas concentrações no trato reprodutivo de fêmeas bovinas, principalmente durante o estro (BLONDIN *et al.*, 2009).

In vitro, antes da capacitação, após o descongelamento da palheta de sêmen, faz-se necessária a utilização de um método de seleção de espermatozoides que resulte em maior motilidade para a FIV. Além disso, na amostra criopreservada existem ainda os crioprotetores que devem ser excluídos antes da fertilização. Os procedimentos de separação de espermatozoides utilizados atualmente para FIV são capazes de melhorar significativamente a qualidade do sêmen por selecionar uma maior taxa de espermatozoides móveis e morfologicamente normais, e por eliminar substâncias indesejadas como os diluidores, o plasma seminal, os agentes infecciosos e espermatozoides mortos (GORDON, 1994).

Dentre as técnicas de seleção de sêmen disponíveis encontram-se os gradientes de centrifugação, sendo o Percoll[®] (Sigma Chemicals Co. – USA) (PARRISH, KROGENAES, SUSKO-PARRISH, 1995) o mais utilizado nos laboratórios comerciais. Formado por partículas de sílica coloidal coberto com polivinilpirrolidona, o percoll é preparado em diferentes concentrações para formar um gradiente descontínuo de duas ou três fases (90, 45 e 30%) para separação espermática (GONÇALVES, VISITIN, OLIVEIRA, 2002).

Para que ocorra o mínimo de polispermia, devem ser realizados testes com diferentes concentrações inseminantes, determinando a concentração de espermatozoides ideal para cada touro, a partir do resultado obtido. No entanto, a aplicabilidade destes testes em laboratórios comerciais não é muito prática e geralmente a concentração utilizada é de 2×10^6 espermatozoides/mL, calculada a partir da motilidade e a população viva de espermatozoides obtida após a centrifugação em gradiente de percoll (GONÇALVES, VISITIN, OLIVEIRA, 2002).

Os sistemas de cultivo utilizados para fecundação *in vitro* apresentam diferenças em relação aos laboratórios. Contudo, obrigatoriamente o meio empregado deve ser capaz de oferecer ao oócito secundário e ao espermatozoide condições propícias para que a penetração ocorra da forma mais rápida possível (GORDON, 1994).

Após a fusão do espermatozóide com o oócito, ocorre a ativação, evidenciada na maioria dos mamíferos pela exocitose dos grânulos corticais e retomada da meiose. O núcleo espermático se descondensa e transforma-se no pronúcleo masculino. O pronúcleo migra para o centro do oócito, o envelope nuclear se desintegra e ocorre a associação dos cromossomos

para a primeira divisão mitótica, a clivagem. Conseqüentemente, inicia-se o desenvolvimento embrionário por sucessivas divisões e alterações morfológicas para a formação de mórulas e blastocistos (YANAGIMACHI, 1994).

2.5 Efeito touro

Touros podem ter respostas diferentes entre si, quanto à capacitação *in vitro*, o que explica em parte, o fato de que nem todos os touros submetidos ao processo de FIV apresentam bons resultados quanto à produção de embriões (FOLHADELLA, 2008).

Coelho *et al.* (1998) avaliaram as condições de cultura para maturação dos oócitos e o efeito do reprodutor sobre as taxas de clivagem (TC) e de mórulas e blastocistos (MO/ BL) produzidos *in vitro*. A TC e a taxa de MO/ BL diferiram ($p < 0,05$) para cada reprodutor. Para tanto, concluíram que a utilização de sêmen de diferentes reprodutores afetou o subsequente desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Diversas evidências têm mostrado a importância do reprodutor no sistema de PIVE. As diferenças existentes entre touros são manifestadas, tanto na capacidade fecundante como na competência de desenvolvimento, mesmo quando algumas variáveis (concentração espermática e de heparina) são padronizadas. Em um mesmo touro, a concentração espermática e de heparina determinam diferenças na taxa de fertilização e na produção de embriões. Portanto, para cada reprodutor utilizado no sistema PIVE, alguns ensaios devem ser previamente desenvolvidos para ajustar a concentração espermática e a dosagem de heparina com a finalidade de maximizar ambos, capacidade fecundante e competência de desenvolvimento embrionário (COELHO *et al.*, 1998).

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. *et al.* **Biologia molecular da célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 506 p.

ALBERTS, B. *et al.* **Molecular biology of the cell**. 4. ed. New York: Garland Science, 2002. 1463 p.

ANCIOTO, K.L. *et al.* Influência das células do cumulus e do meio de maturação “in vitro” de oócitos bovinos sobre a maturação nuclear e aquisição da competência do desenvolvimento embrionário. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.32, p.114, 2004.

ASSUMPÇÃO, M.E. *et al.* Capacitação espermática *in vitro* com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.39, n.3, p.149-156, 2002.

BALL, G.D. *et al.* Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. **Biology of Reproduction**, Madison, v.28, n.3, p.717–725, apr.1983.

BARTH, A.D.; OKO, R.J. Preparation of semen for morphological examination. In: BARTH, A.D.; OKO R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames, Iowa: Iowa State University, 1989, p.8-18.

BAVISTER, B.D. Early history of in vitro fertilization. **Reproduction**, Bristol, v.124, n.2, p.181-196, aug.2002.

BLONDIN, P. *et al.* Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. **Theriogenology**, New York, v.71, n.1, p.30-38, jan.2009.

CARVALHO, O. F.; FERREIRA, J. D. J.; SILVEIRA, N. A. Oxidative effect of nitric oxide and male infertility. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v.38, n.1, p.33-38, jan.2002.

COELHO, L. de A. *et al.* Avaliação das condições de maturação oocitária e do efeito do reprodutor na produção *in vitro* de embriões bovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 35, n. 3, p.120-122, 1998.

CROSS, N. L. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, EUA, v.59, n.1, p.7-11, jul.1998.

CURCIO, A.G. *et al.* Efeito da adição de cafeína e da redução do volume de meio de fertilização *in vitro* sobre a taxa de clivagem e taxa de blastocisto e embriões bovinos. In:

CONGRESSO FLUMINENSE DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA (CONFLICT), 2. **Anais...** Rio de Janeiro, 2010.

DARSZON, A. *et al.* Ion channels in sperm physiology. **Physiological Reviews**, Bethesda, v.79, n.2, p.481-510, apr.1999.

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

DOMÍNGUEZ, J. C. *et al.* Aditivos seminales em la inseminación artificial de La coneja. **Cátedra de Reproducción y Obstetría**. León: Facultad de Veterinaria de La Universidad de León, 2003.

EBNER, T. *et al.* Pharmacological stimulation of sperm motility in frozen and thawed testicular sperm using the dimethylxanthine theophylline. **Fertility and Sterility**, New York, v.96, n.6, p.1331-1336, dec.2011.

FLESCH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1469, n.3, p.197-235, nov.2000.

FOLHADELLA, I.M. **Perfil proteico do sêmen e fertilidade de touros da raça Gir**. [Semen protein profile and fertility in Gyr bulls]. 2008. 66 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, 2008.

FREDHLOM, B. B. Notes on the History of Caffeine Use. In: FREDHOLM., B.B. **Methylxanthines: Handbook of Experimental Pharmacology**, Berlin: Springer, 2011, v.200, p.01-09.

FUNAHASHI, H. Effect of beta mercaptoethanol during in vitro fertilization procedures on sperm penetration into porcine oocytes and the early development in vitro. **Reproduction**, Bristol, v.130, n.6, p.889-898, dec.2005.

FUNAHASHI, H.; NAGAI, T. Regulation of in vitro penetration of frozen-thawed boar spermatozoa by caffeine and adenosine. **Molecular Reproduction and Development**, Hoboken, v.58, n.4, p.424-431, apr.2001.

GADELLA, B.M.; VAN GESTEL, R.A. Bicarbonate and its role in mammalian sperm function. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.82-83, 307-319, jul.2004.

GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozoides e plasma seminal. In: HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7.ed. São Paulo: Manole, 2004, p.97-110.

GONÇALVES, P.B.D. *et al.* Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.2, p.212-217, abr./jun.2007.

GONÇALVES, P.B.; FIGUEIREDO, J.R. de; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008, 395 p.

GONÇALVES, P.B.D.; VISINTIN, J.Á.; OLIVEIRA, M.A.L. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002. p.195-226.

GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. Wallingford, UK: CAB International, 1994. p.30-65.

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

HARRISON, R.A.P.; GADELLA, B.M. Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. **Theriogenology**, New York, v.63, n.2, p.342–351, jan.2005.

HARRISON, R.A.P.; MILLER, N.G.A. cAMP-dependent protein kinase control of plasma membrane lipid architecture in boar sperm. **Molecular Reproduction and Development**, Hoboken, v.55, n.2, p.220–228, feb.2000.

HUGENTOBLER, S. *et al.* In situ oviduct and uterine pH in cattle. **Theriogenology**, New York, v.61, n.7-8, p.1419–1427, may.2004.

HUNTER, R.H.F.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Capacitation of mammalian spermatozoa in vivo, with a specific focus on events in the Fallopian tubes. **Molecular Reproduction and Development**, Hoboken, v.67, n.2, p.243–250, feb.2004.

KOFT, G.S. *et al.* Signal transduction and regulation of sperm function. In: GAGNON, C. **The male gamete: from basic science to clinical applications**. Vienna: Cache River Press, 1999. Cap.11, p.105–118.

LEESE, H.J. The formation and function of oviduct fluid. **Journal of Reproduction and Fertility**, Colchester, v.82, n.2, p.843–856, mar.1988.

LEESE, H.J. *et al.* Formation of Fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. **Reproduction**, Bristol, v.121, n.3, p.339–346, mar.2001.

LENZ, R.W. *et al.* Chondroitin sulfate facilitates an acrosome reaction in bovine spermatozoa as evidenced by light microscopy, electron microscopy and in vitro fertilization. **Biology of Reproduction**, Madison, v.28, n.3, p.683–690, apr.1983.

LITVIN, T.N. *et al.* Kinetic properties of “soluble” adenylyl cyclase. Synergism between calcium and bicarbonate. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.278, n.18, p.15922–15926, may.2003.

MAIA, M.S.; BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.33, n.4, p.183-193, out./dez.2009.

MANJUNATH, P.; THERIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproductive Immunology**, Limerick, v.53, n.1-2, p.109–119, jan.2002.

MIRANDA, M.S. *et al.* Sistemas alternativos de incubação e meios de cultivo para produção *in vitro* de embrião bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.2, p.218-223, abr./jun.2007.

MOORE, K. *et al.* In vitro production of bovine embryos in medium supplemented with a serum replacer: Effects on blastocyst development, cryotolerance and survival to termo. **Theriogenology**, New York, v.68, n.9, p.1316-1325, dec.2007.

NAGAI, T. *et al.* Effects of caffeine on in vitro fertilization of pig follicular oocytes. **Journal of Reproduction Development**, Tokyo, v.39, n.4, p.347–352, 1993.

NASCIMENTO, Aníbal Ballaarotti. **Efeito da água de coco e BTS associados à cafeína na capacitação espermática *in vitro* em suínos**. 2003. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)- Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza – CE, 2003.

NIWA, K.; OHGODA, O. Synergistic effect of caffeine and heparin on in-vitro fertilization of cattle oocytes matured in culture. **Theriogenology**, New York, v.30, n.4, p.733-741, oct.1988.

PARRISH, J.J. Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. **Theriogenology**, New York, v.81, n.1, p.67–73, feb.2014.

PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J.L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, New York, v.44, n.6, p.859-869, oct.1995.

PARRISH J.J.; SUSKO-PARRISH J.L.; FIRST N.L. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm in vitro. **Theriogenology**, New York, v.24, n.5, 537–549, nov.1985.

PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; FIRST, N.L. Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. **Biology of Reproduction**, Madison, v.41, n.4, p.683–699, oct.1989.

PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; GRAHAM, J.K. In vitro capacitation of bovine spermatozoa: role of intracellular calcium. **Theriogenology**, New York, v.51, n.2, p.461–472, jan.1999.

PARRISH, J.J. *et al.* Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. **Biology of Reproduction**, Madison, v.40, n.5, p.1020–1025, may.1989a.

PARRISH, J.J. *et al.* Effects of sulfated glycoconjugates on capacitation and the acrosome reaction of bovine and hamster spermatozoa. **Gamete Research**, New York, v.24, n.4, p.403–413, dec.1989b.

PARRISH, J.J. *et al.* Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology of Reproduction**, Madison, v.38, n.5, p.1171–1180, jun.1988.

PAUWELS, R.A. *et al.* Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v.163, n.5, p.1256-1276, apr.2001.

POZZOBON, S.E. *et al.* Addition of recombinant human growth hormone to in vitro maturation medium of bovine oocytes. **Reproduction of Domestic Animals**, Berlin, v.40, n.1, p.19-22, feb.2005.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Role of the oviduct in sperm capacitation. **Theriogenology**, New York, v.68, n.1, p. 138–146, set.2007.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. *et al.* Boar spermatozoa in the oviduct. **Theriogenology**, New York, v.63, n.2, p.514–35, jan.2005.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. *et al.* Involvement of oviduct in sperm capacitation and oocyte development in pigs. **Reproduction Supplement**, Cambridge, v.58, p.129– 145, 2001.

SETCHELL, B.P. Spermatogenesis and spermatozoa. In: AUSTIN, C.R.; SHORT, R.V. **Germ cells and fertilization**. New York: Oxford University Press, 1993. p.63-101.

SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, New York, v.65, n.5, p.958-978, mar.2006.

TAKAHASHI, Y.; FIRST, N.L. In vitro fertilization of bovine oocytes in the presence of theophylline. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.34, n.1, p.1–18, nov.1993.

TAJIK, P.; NIWA, K. Effects of caffeine and/or heparin in a chemically defined medium with or without glucose on in vitro penetration of bovine oocytes and their subsequent development. **Theriogenology**, New York, v.49, n.4, p. 771-777, mar.1998.

VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. de A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.32, n.2, p.100-109, abr./jun. 2008.

VISCONTI, P.E *et al.* Roles of bicarbonate, cAMP, and protein tyrosine phosphorylation on capacitation and the spontaneous acrosome reaction of hamster sperm. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 61, n.1, p. 76–84, jul.1999.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: Knobil A, Neill JD, editors. **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1994. p. 189–317.

YOSHIOKA, K.C. *et al.* Production of piglets derived from in vitro-produced blastocysts fertilized and cultured in chemically defined media: effects of theophylline, adenosine, and cysteine during in vitro fertilization. **Biology of Reproduction**, Madison, v.69, n.6, p.2092-2099, dec.2003.

ZHOU, C.X; WANG, X.F.; CHAN, H.C. Bicarbonate secretion by the female reproductive tract and its impact on sperm fertilizing capacity. **Sheng Li Xue Bao**, Beijing, v.57, n.2, p.115–124, apr.2005.

CAPÍTULO 1 - Biology of Reproduction – Qualis A1 – Situação: A ser submetido**Teofilina como agente de capacitação do sêmen bovino**

SILVA¹, Laíla Pereira da; RIBEIRO¹, Josiane Rossi; FERNANDES¹, Carlos Antônio Carvalho; CARVALHO², Bruno Campos de; GIOSO¹, Marilu Martins; VARAGO¹, Fabiana Cristina

¹*Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS, Alfenas – MG*

²*Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora - MG*

Resumo: A capacitação deve receber especial atenção durante a produção *in vitro* de embriões (PIVE), pois interfere no sucesso da produção embrionária. Objetivou-se avaliar a teofilina como agente capacitante substituto ou associado à heparina no desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro* e sobre a reação acrossômica dos espermatozoides. O experimento foi realizado com 4 touros e 3 tratamentos contendo os agentes capacitantes, totalizando 12 grupos experimentais. Cada touro foi avaliado em cada tratamento descrito a seguir: Tratamento 1 (T1): Heparina - 10µg/mL; Tratamento 2 (T2): Teofilina – 5 mM; Tratamento 3 (T3): Heparina (10µg/mL) + Teofilina (5mM). O sêmen dos touros foi submetido à incubação com os três tratamentos por 0, 6, 12 e 18h, corados com *Trypan blue*/Giemsa e analisados em microscopia eletrônica para avaliação da reação acrossômica. Para a PIVE foram utilizados os mesmos touros e os agentes capacitantes foram adicionados aos meios de fertilização. Na análise espermática, a taxa de reação acrossômica verdadeira foi maior ($p < 0,05$) no tempo 0h, enquanto para os espermatozoides mortos as maiores taxas ($p < 0,05$) foram nos tempos de 12h ($84,46 \pm 5,82$) e 18h ($86,75 \pm 4,19$). A taxa de embriões produzidos na PIVE ($37,97 \pm 13$) e a taxa de eclosão ($33,50 \pm 14$) foram maiores ($p < 0,05$) para o tratamento heparina. Não foi observada diferença ($p > 0,05$) entre os touros na PIVE e entre os tratamentos na análise de reação acrossômica. A utilização da teofilina apresentou as menores taxas de produção embrionária e se mostrou tão eficiente quanto a heparina na indução da reação acrossômica.

Palavras-chave: Fertilização, Reação acrossômica, Espermatozoides, Metilxantinas.

INTRODUÇÃO

A capacitação deve receber especial atenção durante a produção *in vitro* de embriões (PIVE), já que em condições fisiológicas os espermatozoides, obrigatoriamente, sofrem esse processo durante a passagem pelo trato genital da fêmea para se tornarem aptos a fecundação [1]. Para completar o processo de capacitação, os espermatozoides hiperativados se ligam por meio de receptores da membrana plasmática a proteínas específicas na zona pelúcida do oócito de maneira a induzir a reação acrossômica [2]. A reação acrossômica é um processo de exocitose que libera enzimas hidrolíticas que facilitam a penetração do espermatozoide na zona pelúcida e modificam as membranas da região pós-acrossomal, local da interação entre oócito e espermatozoide [3].

O processo de capacitação natural ocorre pela ação de componentes presentes na tuba uterina que vão induzir mudanças no espermatozoide, como os glicosaminoglicanos. O glicosaminoglicano mais utilizado em laboratórios de PIVE bovinos para induzir a capacitação espermática é a heparina [4]. A ligação da heparina se dá por uma série de proteínas do plasma seminal bovino, que se prendem ao espermatozoide na ejaculação, e interagem com o colesterol e os fosfolipídeos da membrana plasmática. Após a ligação à heparina, há uma perda de componentes da superfície do espermatozoide, incluindo uma perda da lecitina, das proteínas do plasma seminal, do colesterol e dos fosfolipídeos [5]. Outras alterações estão relacionadas à ligação da heparina na célula espermática, como alterações de pH intracelular, de cálcio intracelular e os níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) [6].

No entanto, touros podem ter respostas diferentes entre si, quanto à capacitação *in vitro*, o que explica em parte, o fato de que nem todos os touros submetidos ao processo de fertilização *in vitro* (FIV) apresentam bons resultados quanto à produção de embriões [7]. Por esta razão, a procura de um agente que possa agir em conjunto com a heparina ou isoladamente de forma a proporcionar maior capacitação espermática tem sido buscado nos últimos anos.

Dessa forma, as metilxantinas, que inibem as fosfodiesterases aumentando os níveis de AMPC, além de promoverem efeito na concentração de cálcio intracelular [8] desempenhariam um papel de desencadeadores da capacitação. A teofilina, que possui mecanismo de ação mais potente que a cafeína, de acordo com poucos estudos encontrados na literatura pode aumentar a capacidade dos espermatozoides em se ligar a oócitos maturados *in vitro* tanto na espécie bovina [9] quanto suína [10].

Neste sentido, o objetivo do estudo foi testar a teofilina como possível agente de capacitação na espécie bovina, bem como a sua associação com a heparina no desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro* e na indução da reação acrossômica dos espermatozoides.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes e Meios

Todos os meios utilizados para PIVE: meio de maturação, meio de fecundação, gradiente de percoll 90 e 45% e o meio *synthetic oviductal fluid* (SOF) foram adquiridos da empresa Biodux ® (Campinas, SP, Brasil).

A teofilina foi adquirida da Sigma-Aldrich ® Código T1633.

Pré-seleção dos touros

Após avaliação do sêmen de 11 touros pelas análises de motilidade e vigor, análise morfológica e integridade funcional da membrana plasmática avaliada pelo teste hiposmótico (HO), dois touros superiores e dois inferiores quanto à viabilidade espermática *in vitro* foram selecionados, chamados como A, B, C e D, sendo os touros A e C superiores, B e D inferiores. Diante da impossibilidade de encontrar um ou dois touros com desempenho superior ou inferior em todos os parâmetros e uma vez que para alguns parâmetros como a motilidade muitos touros tiveram igual desempenho, a seleção dos touros foi baseada no parâmetro morfologia. A morfologia segundo Barth e Oko [11] possui relação direta com a fertilidade e também por esta razão foi o parâmetro considerado na seleção dos touros a serem testados.

Experimentos

Experimento 1. Análise da reação acrossômica: Foram adicionados os agentes de capacitação aos meios de fertilização, constituindo os tratamentos: Tratamento 1 (T1): Heparina - 10µg/mL; Tratamento 2 (T2): Teofilina – 5 mM; Tratamento 3 (T3): Heparina (10µg/mL) + Teofilina (5mM). A concentração de 10µg/mL de heparina foi escolhida baseada na rotina de produção da maioria dos laboratórios comerciais de FIV. A concentração de teofilina foi

escolhida baseada no estudo de Takahashi e First [9] que relataram um aumento da capacidade fertilizante dos espermatozoides e do processo de FIV em bovinos com a concentração de 5 mM de teofilina.

O sêmen, após descongelamento e seleção por gradiente de Percoll 90 e 45% como descrito por Parrish *et al.* [12], foi incubado em meio de fertilização de acordo com o tratamento T1, T2 e T3 na concentração de 2×10^6 espermatozoides/mL em incubadora a 38,8°C, 5% de CO₂ e umidade saturada, na ausência de oócitos. Uma amostra de cada reprodutor foi submetida à técnica de coloração imediatamente após o descongelamento e novamente a cada 6 horas de incubação sendo que as análises foram realizadas às 0, 6, 12 e 18 horas.

A integridade do acrossomo foi avaliada empregando-se a técnica de dupla coloração (*Trypan blue*/Giemsa – TBG) descrita por Didion *et al.* [13]. O sêmen foi incubado na proporção 1:1 com *trypan blue* 0,2% em banho-maria à 37°C/ 15 min, seguido de adição de 8 mL de DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) e centrifugação a 700 G por 6 min. Do pellet formado foram feitos esfregaços em lâminas que foram coradas com solução de Giemsa a 5% por cerca de 60 min, e posteriormente lavadas e secas ao ar. As análises foram realizadas em duplicata.

A leitura foi realizada em microscópio de campo claro com aumento de 1000x, contando-se 200 células em cada lâmina para avaliação das seguintes características: *Reação acrossômica verdadeira* - Acrossomo e região pós-acrossomal não coradas; *Reação acrossômica falsa* - Acrossomo não corado e região pós-acrossomal corada em azul; *Mortos* - Corados em azul pelo *trypan blue* na região pós-acrossomal e acrossomo corado em roxo ou rosa pelo Giemsa.

Experimento 2. Produção in vitro de embriões: Foram utilizados ovários obtidos em matadouros. Os folículos ovarianos entre 2 a 8 mm de diâmetro foram aspirados com auxílio de seringa de 10 mL acoplada à agulha 40 x 12 mm. Os complexos cumulus-oócitos (COCs) imaturos classificados como “viáveis” de acordo Viana *et al.* [14] foram incubados em meio de maturação composto de TCM 199 (Earle), suplementado com 10% de soro fetal bovino, piruvato (22µg/mL), hormônio luteinizante (50µg/mL), hormônio folículo estimulante (0,5µg/mL) e os antibióticos penicilina e gentamicina (50µg/mL de cada) sob óleo mineral. Os COCs foram maturados a 38,8°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ar e umidade saturada por 24 horas.

Após a maturação, os COCs foram transferidos para placas contendo meio de fecundação suplementado com gentamicina e penicilina (50µg/mL de cada), penicilamina (2,7µg/mL), hipotaurina (1µg/mL), epinefrina (0,3µg/mL), albumina sérica bovina 8806 (5µg/mL) e piruvato (22µg/mL), sob óleo mineral. Ao meio de FIV, também foram adicionados os agentes de capacitação constituindo os tratamentos T1, T2 e T3 como já descrito no experimento 1. Os espermatozoides foram selecionados por gradiente de percoll [12] e as gotas de FIV inseminadas com 2×10^6 espermatozoides/mL. Os oócitos e espermatozoides foram mantidos em incubadora a 38,8°C contendo 5% de CO₂ em ar e umidade saturada por 12 horas. O dia da fecundação foi considerado como o dia 0 (D0).

Após o co-cultivo, os possíveis zigotos foram incubados meio *synthetic oviductal fluid* (SOF) suplementado com inositol (0,5µg/mL) e tricitrato de sódio (0,1µg/mL), a 38,8°C contendo 5% de CO₂ e umidade saturada. A taxa de clivagem, produção embrionária e eclosão foram avaliadas dois, sete e 10 dias após a fecundação, respectivamente.

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando modelos lineares generalizados (PROC GLM). Todas as médias foram comparadas pelo teste Tukey Kramer ($p < 0,05$), utilizando o programa estatístico SAS, versão 9.2 (SAS Institute, USA).

RESULTADOS

Experimento 1

Não houve diferença ($p > 0,05$) quanto à classificação espermática em função dos três tratamentos como observado na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação espermática relativa à ocorrência de reação acrossômica após coloração dupla *Trypan blue*/ Giemsa em função do tratamento.

Tratamento	Classificação espermática		
	Reação acrossômica verdadeira (%)	Reação acrossômica falsa (%)	Mortos (%)
Heparina	25,75 ± 23,33	8,68 ± 3,02	63,37 ± 23,55
Teofilina	21,78 ± 24,89	7,71 ± 3,43	70,40 ± 25,84
Heparina + Teofilina	24 ± 24,38	6,78 ± 3,19	69,21 ± 25,49

Médias analisadas pelo teste Tukey Kramer ($p > 0,05$) (SAS 9.2). Resultados expressos em Média ± erro padrão.

A reação acrossômica verdadeira foi maior ($p < 0,05$) no tempo 0h em relação aos tempos de 6h, 12h e 18h, sendo iguais os tempos de 12h e 18h como observado na Tabela 2. Na reação acrossômica falsa não houve diferença ($p > 0,05$) entre os tempos de incubação, descrito na Tabela 2. Para os espermatozoides classificados como mortos foi observado uma maior taxa ($p < 0,05$) nos tempos de 12h e 18h em comparação aos tempos de 6h e 0h, de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2. Classificação espermática relativa à ocorrência de reação acrossômica após coloração dupla *Trypan blue*/ Giemsa em função do tempo.

Tempo (hs)	Classificação espermática		
	Reação acrossômica verdadeira (%)	Reação acrossômica falsa (%)	Mortos (%)
0	61,50 ± 6,78 ^A	9,13 ± 3,72	29,38 ± 4,51 ^C
6	19,63 ± 12,71 ^B	7,25 ± 3,17	72,75 ± 13,09 ^B
12	7,21 ± 4,40 ^C	8,33 ± 3,06	84,46 ± 5,82 ^A
18	7,04 ± 2,66 ^C	6,21 ± 2,59	86,75 ± 4,19 ^A

Letras na coluna diferem pelo teste Tukey Kramer ($p < 0,05$) (SAS 9.2). Resultados expressos em Média ± erro padrão.

Experimento 2

A taxa de clivagem não diferiu ($p > 0,05$) entre os três tratamentos (Tabela 3). A taxa de embriões produzidos bem como a taxa de eclosão (Tabela 3) foram maiores ($p < 0,05$) para o tratamento heparina em relação aos tratamentos teofilina e heparina + teofilina.

Tabela 3. Taxas de clivagem, produção embrionária e eclosão em função de tratamento.

	Oócitos	Taxas de clivagem (%)	Taxas de embriões produzidos (%)	Taxas de eclosão (%)
Heparina	909	60,52 ±15,58	37,97 ^A ±13,12	33,50 ^A ±14,05
Teofilina	880	62,14 ±15,63	28,55 ^B ±10,13	22,81 ^B ±10,77
Heparina + Teofilina	884	62,02 ±19,02	27,60 ^B ±11,36	23,08 ^B ±10,40
Média geral		61,41 ±16,67	31,43 ±12,43	26,55 ±12,77

Letras na coluna diferem pelo teste Tukey Kramer ($p < 0,05$) (SAS 9.2). Resultados expressos em Média \pm desvio padrão.

Não houve efeito de touro nas taxas de clivagem, embriões produzidos e eclosão ($p > 0,05$), como observado na tabela 4.

Tabela 4. Taxas de clivagem, produção embrionária e eclosão em função de touro.

	Oócitos	Taxas de clivagem (%)	Taxas de embriões produzidos (%)	Taxas de eclosão (%)
Touro A	687	64,15 ±13,06	31,77 ±13,96	26,97 ±14,27
Touro B	662	56,79 ±16,86	30,01 ±11,04	26,70 ±11,07
Touro C	663	64,04 ±15,44	33,97 ±12,37	27,30 ±13,03
Touro D	661	61,26 ±20,29	29,76 ±12,27	24,89 ±13,01

Médias analisadas pelo teste Tukey Kramer ($p > 0,05$) (SAS 9.2). Resultados expressos em Média \pm desvio padrão.

DISCUSSÃO

Experimento 1

Sabendo-se que a coloração dupla de *Trypan blue*/Giemsa é empregada para estimar o potencial de fecundação de amostras de sêmen bovino destinadas à FIV ou à inseminação artificial [15], observou-se que, contrariamente ao que se esperava a teofilina ou a sua associação com a heparina não foram eficientes em aumentar a taxa de reação acrossômica

verdadeira em bovinos. Ainda foi possível observar que, independente do agente de capacitação, a incidência de reação acrossômica verdadeira foi relativamente baixa em comparação ao índice de espermatozoides mortos (Tabela 1). Isso pode ser decorrente do tempo total de incubação (18 horas), o que pode ser diretamente constatado ao avaliar os resultados de reação acrossômica em função do tempo (Tabela 2), que constatou grande taxa de morte espermática já às 6 horas de incubação. De acordo com relatos de Parrish *et al.* [16] a taxa de fecundação e a reação acrossômica são dependentes do tempo de exposição dos espermatozoides à heparina, uma vez que após 2 horas de incubação ocorre saturação das ligações da heparina com as células espermáticas, impedindo que haja um aumento da taxa de fecundação e um maior tempo de incubação. Alguns autores relatam que não houve diferença da frequência de reação acrossômica entre 4, 5 e 8h de incubação com a heparina [17], enquanto outros ao comparar os tempos de incubação de 4, 6 e 9h, observaram que o período de 6h apresentou os melhores resultados [18].

No presente estudo as avaliações foram realizados em intervalo maior de tempo (a cada 6 horas) de forma que não é possível concluir se houve um aumento na incidência de reação acrossômica a cada hora com início de queda a determinado ponto. O que é possível inferir, uma vez que o número de espermatozoides mortos foi bastante elevado já às 6 horas de incubação, é que as condições de incubação a que os espermatozoides foram submetidos, ou seja, na ausência de COCs e de fatores de crescimento que esses conhecidamente secretam e que são capazes de desencadear o estímulo da reação acrossômica [19] prejudicaram a viabilidade espermática *in vitro*.

Experimento 2

Para um bom sistema de produção embrionária *in vitro*, valores entre 60 e 80% podem ser esperados para taxa de clivagem, enquanto para taxa de produção embrionária estes valores encontram-se entre 25 e 40% [20, 21]. Os resultados observados no presente estudo (Tabela 3) para os parâmetros acima citados estão dentro do reportado na literatura, evidenciando condições adequadas de produção.

Quando comparados os grupos experimentais, a produção embrionária para os tratamentos que continham teofilina foi menor que a observada para o tratamento heparina (Tabela 3). Aparentemente, a teofilina isolada ou associada à heparina, não induziu boa capacitação espermática, o que acarretaria diminuição no índice de fertilização, resultando em menor taxa de produção embrionária. Porém, a taxa de clivagem não diferiu entre os grupos e

os resultados encontrados a partir da coloração espermática pós-incubação do sêmen com os agentes capacitantes (Tabela 1 – experimento 1) corroboram os achados da taxa de clivagem, ou seja, não foram observadas diferenças no índice de espermatozoides com reação acrossômica verdadeira entre os tratamentos. Sendo assim, a diferença de produção embrionária entre os grupos pode ser atribuída ao fato que nem todos os oócitos que sofreram clivagem foram competentes em sustentar o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto.

Três possíveis explicações podem ser discutidas. Inicialmente, essa menor produção embrionária pode estar atribuída aos espermatozoides, pois de acordo com Coelho *et al.* [22], a fertilidade do sêmen pode ser atribuída a dois principais fatores: a capacidade de fecundação e a competência de desenvolvimento pós-fecundação. Nesse caso, é possível que a teofilina, mesmo induzindo uma boa resposta quanto capacitação e taxa de fecundação, tenha sido tóxica ao DNA do espermatozoide, o que impossibilitou sustentar o desenvolvimento até a fase de pré-implantação.

Além disso, a presença de teofilina no meio de fecundação pode ter aumentado a incidência de fecundações anormais, principalmente polispermia durante a FIV [23]. De fato, o aumento da polispermia tende a diminuir a taxa de fecundação monospermática e aumentar a taxa de clivagem, porém, os embriões clivados provenientes de fecundação polispermática, frequentemente, não se desenvolvem até o estágio de blastocisto, por serem vindos de fecundação anormal [24], o que está de acordo com o observado no presente estudo com o uso da teofilina isolada ou associada à heparina. Foi relatado por Tesarik *et al.* [25] que a atividade máxima das metilxantinas é alcançada após 10 minutos, e que essa fase ativa é de menos de 2h, ou seja, seu efeito é a curto prazo. O que foi comprovado por Takahashi e First [9], que concluíram que a teofilina acelera o processo de FIV em bovinos. Deste modo, acredita-se que a teofilina possa ter causado a polispermia ao potencializar a capacitação espermática induzindo à alta concentração de espermatozoides capacitados de uma só vez. Como relatado por Ramos *et al.* [24], em altas concentrações espermáticas, possivelmente existe alto teor de enzimas hidrolíticas liberadas pela presença de espermatozoides, o que facilita a ocorrência da polispermia, já que tais enzimas em excesso podem auxiliar na penetração de mais de um espermatozoide.

Finalmente, a incubação com teofilina pode ter prejudicado a ativação do genoma embrionário (AGE), com consequências para a transição materno zigótica e resultando em aumento de bloqueio do desenvolvimento embrionário. Sabe-se que a transcrição materno zigótica, processo caracterizado pela iniciação da transcrição no embrião e substituição do

RNA_m materno pelo RNA_m embrionário, envolve eventos morfológicos e fisiológicos, como a formação do zigoto, AGE e a diferenciação celular durante a formação do blastocisto que são influenciados por diversos fatores relacionados ao sistema de cultivo celular [26]. Como a AGE só ocorre mais tardiamente no desenvolvimento embrionário, após a independência dos genes maternos presentes no oócito que são responsáveis por manter o desenvolvimento inicial [27], essa alteração não seria percebida na avaliação da taxa de clivagem. Para confirmar essa possibilidade seria necessário uma avaliação diária do desenvolvimento para constatação do número de estruturas que pararam seu desenvolvimento no estágio de 8 para 16 células, quando ocorre a AGE em bovinos [28], o qual está associado ao bloqueio do desenvolvimento embrionário. No entanto, esses dados não encontram-se disponíveis.

Apesar de, no presente estudo, a teofilina ter resultado em menor produção embrionária, este agente produziu resultados satisfatórios em suínos, quando Yoshioka *et al.* [10] utilizando 2,5 mM de teofilina no meio de capacitação encontraram $74,0 \pm 7,0$ de taxa de clivagem enquanto que na concentração de 1,25 mM, a taxa de clivagem foi de $71,5 \pm 7,5$. Tais resultados sinalizam a possibilidade, também na espécie bovina, que melhores resultados possam ser obtidos quando uma dose menor de teofilina for testada. Kang *et al.* [29], trabalhando com uma concentração de 2,5 mM de teofilina em combinação com uma mistura de PHE (penicilamina, hipotaurina e epinefrina) constataram que essa associação acelerou a motilidade e a penetração espermática em oócitos bovinos, resultando em taxas de fertilização e de blastocisto esperadas. No entanto, esses autores não testaram outras concentrações de teofilina. Takahashi e First [9], estudando diferentes concentrações de teofilina, obtiveram melhores taxas de produção em bovinos com 2,5 mM e 5 mM, concluindo que estas concentrações aumentaram a capacidade fecundante dos espermatozoides.

Quando comparado os touros, não houve diferença estatística na produção embrionária entre eles (Tabela 4). Dessa forma, é provável que o número de animais avaliados pode ter sido relativamente pequeno, não sendo possível encontrar diferença na população amostrada, ou ainda é possível que os agentes capacitantes influenciaram as respostas individuais dos touros. Como relatado por Niwa e Ohgoda [30], a incubação de espermatozoides na presença de heparina em combinação com cafeína melhorou a frequência de fertilização e diminuiu a diferença entre os touros, acreditando-se que tal combinação pode reduzir os efeitos individuais de touro, o que pode explicar a ausência de diferenças entre os touros utilizados.

CONCLUSÃO

A teofilina se mostrou tão eficiente quanto à heparina na indução da reação acrossômica, no entanto, quando testada no meio de fecundação em bovinos resultou em menores taxas de produção embrionária, tanto isolada quanto associada à heparina. Contudo, as taxas de fecundação obtidas com a teofilina, sugerem que novos estudos devem ser realizados com diferentes concentrações dessa metilxantina isolada ou associada a outros agentes capacitantes a fim de sempre buscar melhores resultados na PIVE.

Agradecimentos

À FAPEMIG (Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais) e à Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

REFERÊNCIAS

1. Gordon I. Oocyte recovery and maturation. In: Gordon I., Laboratory production of cattle embryos. Wallingford, UK: CAB International; 1994: 30-65.
2. Florman HM, First NL. The regulation of acrosomal exocytosis 1: Sperm capacitationis required for the induction of acrosome reaction by the bovine zona pellucida in vitro. *Dev Biol*, 1988; 128: 453-463.
3. Shidu KS, Guraya S. Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Int Rev Cytol* 1989; 118: 231-280.
4. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 1988; 38: 1171–1180.
5. Manjunath P; Therien I. Role of seminal plasma phospholipid binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol* 2002; 53: 109–119.
6. Parrish J.J. Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology* 2014; 81: 67–73.
7. Folhadella, I.M. Perfil protéico do sêmen e fertilidade de touros da raça Gir. [Semen protein profile and fertility in Gyr bulls]. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 2008. Tese

8. Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS, GOLD Scientific Committee. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1256-1276.
9. Takahashi Y, First NL. In vitro fertilization of bovine oocytes in the presence of theophylline. *Anim Reprod Sci* 1993; 34: 1-18.
10. Yoshioka K, Suzuki, C, Itoh S *et al.* Production of piglets derived from in vitro-produced blastocysts fertilized and cultured in chemically defined media: effects of theophylline, adenosine, and cysteine during in vitro fertilization. *Biol Reprod* 2003; 69: 2092-2099.
11. Barth AD, Oko, RJ. Preparation of sêmen dor morphological examination. In: Barth AD, Oko RJ, *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*, Ames, Iowa: Iowa State University; 1989; 8-18.
12. Parrish JJ, Krogenaes, Susko-Parrish JL. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology* 1995; 44: 859-869.
13. Didion BA, Dobrinski JR, Giles JR, Graves CN. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Res* 1989; 22: 51-57.
14. Viana JHM., Camargo LSA, Ferreira AM, Sa WF, Fernandes CAC, Marques Junior AP. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. *Animal Reproduction Science* 2004; 84: 1-12.
15. Tartaglione CM, Ritta MN. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 2004; 62: 1245-1252.
16. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NL. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm in vitro. *Theriogenology* 1985; 24: 537-549.
17. Miller DJ, Hunter AG. Effect of osmolality and glycosaminoglycans on motility, capacitation, acrosome reaction, and in vitro fertilizability of bovine ejaculated sperm. *Journal of Dairy Science* 1986; 69: 2915-2924.
18. Assumpção ME, Haipeck OD, Lima KA *et al.* Capacitação espermática in vitro com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 2002; 39: 149-156.

19. Meizel S, Turner KO. Chloride efflux during the progesterone-initiated human sperm acrosome reaction is inhibited by lavendustin A, a tyrosine kinase inhibitor. *Journal of Andrology* 1996; 17: 327-330.
20. Lonergan P, Rizos D, Ward F, Boland MP. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reprod Nutr Dev* 2001; 41:427-437.
21. Pugh PA, Tervit HR, Niemann H. Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine in vitro produced embryos following in straw dilution in vitro and in vivo following transfer. *Anim Reprod Sci* 2000; 58: 9-22.
22. Coelho L.A, Esper C.R, Garcia J.M, Vantini R, Silva Filho IR, Almeida Jr. IL. Avaliação das condições de maturação oocitária e do efeito do reprodutor na produção in vitro de embriões bovinos. *Braz J Vet Res Anim Sci* 1998; 35: 120-122.
23. Chian, RC, Nakahara H, Kiwa K. *et al.* Fertilization and early cleavage in vitro of ageing bovine oocytes after maturation in culture. *Theriogenology* 1992; 37: 665-672.
24. Ramos AA, Camargo LSA, Sá WF, Ferreira AM, Costa EP. Fecundação in vitro com sêmen de bovinos da raça Gir. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2000; 52: 360-365.
25. Tesarik J, Thebault A, Testart J. Effect of pentoxifylline on sperm movement characteristics in normozoospermic and asthenozoospermic specimens. *Hum Reprod* 1992; 7: 1257-1263.
26. Zimmermann JW, Schultz, RM. Analysis of gene expression in the preimplantation mouse embryo: Use of mRNA differential display. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 5456-5460.
27. Memili E, Dominko T, First NL. Onset of transcription in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 1998; 51: 36-41.
28. Sousa PA, Westhusin ME, Watson AJ. Analysis of variation in relative mRNA abundance for specific gene transcripts in single bovine oocytes and early embryos. *Mol Reprod Develop* 1998; 49:119-130.
29. Kang SS, Koyama K, Huang, W, Yanagawa Y, Takahashi Y, Nagano M. Addition of D-penicillamine, hypotaurine, and epinephrine (PHE) mixture to IVF medium maintains motility and longevity of bovine sperm and enhances stable production of blastocysts in vitro. *Journal of Reproduction and Development* 2014; (in press). Published online ahead of print December 2014; DOI 10.1262/jrd.2014-112.
30. Niwa K, Ohgoda O. Synergistic effect of caffeine and heparin on in-vitro fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology* 1988; 30: 733-741.

ANEXO – NORMAS DE PUBLICAÇÃO

BIOLOGY OF REPRODUCTION MANUSCRIPT SUBMISSION CHECKLIST

Preparing a Submission

Manuscript Formatting

Failure to comply with these requirements may lead to processing delays. See recent BOR papers for examples of manuscript format. Please contact the BOR Editorial Office with any questions.

Title page

Title. Indicate the species studied, using italics as needed. Do not use abbreviations or acronyms. Spell out Greek characters.

Running title. A title of 50 or fewer characters, including spaces. This will appear as the running head of your published paper.

Summary sentence. A one-sentence summary of the manuscript's significance (limited to 250 characters). Do not use phrases such as "this paper demonstrates..." or "we show that..." Examples of appropriate summary statements are:

- The protein greatstuff (GTSF), which is produced by the developing oocyte, is essential for preimplantation embryo development beyond the two-cell stage.
- Photoperiod regulation of amino acid transport in the brain influences spawning behavior of guppies.
- Rat Sertoli cells promote high expression of Clutz mRNA and CLUTZ protein by spermatocytes; the phenotype of a null mutation in the Clutz gene is azoospermia.

Keywords. Title page keywords will appear on the first page of the final publication. There is no limit on the number of keywords that may be provided.

Authors and affiliations. List all authors and provide the full name (including departments and/or divisions) and location (i.e., city, state, country) of each institution where work was performed. Do not use abbreviations or acronyms, and do not provide street addresses. Use superscript Arabic numerals to key the authors to the institutions.

Grant support. Indicate financial support (i.e., funding agency names and grant or contract numbers, if applicable) in footnote 1. Do not include funding information in the Acknowledgment section.

Correspondence. The corresponding author should be indicated in footnote 2; the footnote should give the complete contact information, including street address, for this person.

Additional footnotes. If two or more authors contributed equally to the work, or if an author's contact address has changed since the research was performed, this information should be provided in separate footnotes.

Abstract.

In a maximum of 250 words, summarize the purpose of the work, the methods used, and the conclusions. Do not present data or cite references. Avoid abbreviations and acronyms, and spell out Greek characters.

Introduction.

Provide a clear statement of the problem and cite the relevant literature on the subject. Do not include results or summary statements.

Materials and Methods.

Ethics. It must be stated and documented that investigations using experimental animals or subjects were conducted in accordance with the SSR's specific guidelines and standards.

Materials. Brand names. Use generic names of chemicals, drugs, antibodies, reagents, enzymes, etc., when possible. Brand names should be used if the composition of that brand is critical to the methodology. If a brand name is given, the name of the manufacturer must also be provided.

Composition. Specify the composition of all solutions, buffers, mixtures, and culture media (including PBS) if a brand name and manufacturer are not provided.

Donated materials. Provide institutional affiliations of individuals or companies that donated supplies or reagents.

Trademark symbols. Do not use trademark or registered symbols with brand or company names.

Methods.

Concisely provide readers with sufficient information to replicate the work. Unpublished work may not be cited to provide validation of methodology. Include statistical methods used for data analysis. Use references to published methods if they are identical to methods used in the current study.

Results.

Present findings in appropriate detail, using the past tense. Refer to tables and figures in order, without discussion.

Nucleotide sequences should be submitted to GenBank, EMBL, or DNA Data Bank of Japan, and the accession number and date of accession noted in the text. Authors are encouraged to provide a link to the deposit rather than providing the complete sequence in the text.

Genomic and proteomic data should be deposited with the NCBI gene expression and hybridization array data repository (GEO). The GEO accession number and sequence deposit information should be referenced in footnote 1 after any funding information.

Discussion.

Provide a clear and concise interpretation of the results; avoid repeating the results.

Acknowledgment.

Acknowledge any non-financial assistance (e.g., statistical review, technical help, editorial assistance).

References.

Acceptable works. Only published articles or articles accepted for publication may be used. Articles must have appeared in peer-reviewed publications or other published works that are accessible to most scientists. Articles that have been "conditionally accepted," "submitted," or are "in process" are not acceptable. If a paper has been accepted but has not been published in final form (i.e., full citation information is not yet available), please indicate that the paper is "in press" (see Journal article, published ahead of print).

- **Abstracts.** An abstract may be used as a reference only if it has been published in a regular issue of a readily available and indexed journal.
- **Internet/online references.** All online material must be cited completely and must include the web address and date of access by the authors. Many online sources provide a suggested citation.

- **Unpublished data.** Cite personal communications and unpublished data only if necessary. In the text, provide the name(s) of the individual(s) associated with the unpublished data. For example, "(Smith and Winter, unpublished data)."

Accuracy. Authors are responsible for the accuracy of all references. If reference changes are required at proof, authors will be charged for each alteration.

Order. All references should be cited in numerical order in the text using square brackets (e.g., "as Smith [12] reported" or "as previously reported [3-5]") and should appear in that order in the References section. If a reference citation appears only in a table or figure, number that reference last. For example, if there are 50 references in the text, four in a table, and two in a figure, the intext references would be numbered 1-50, the references in the table would be numbered 51-54, and the references in the figure would be numbered 55-56.

APÊNDICE I – MATERIAL E MÉTODOS

Local e Reagentes

Os estudos foram conduzidos nos Laboratórios de Reprodução Animal do Departamento de Veterinária da Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS e no Laboratório de Produção de Embriões da Biotran, ambos em Alfenas – MG.

Todos os meios utilizados para PIVE: meio de maturação, meio de fecundação, gradiente de percoll 90 e 45% e o meio *synthetic oviductal fluid* (SOF) foram adquiridos da empresa Biodux ® (Campinas, SP, Brasil).

A teofilina foi adquirida da Sigma-Aldrich ® Código T1633.

Delineamento experimental

O experimento foi realizado em um Delineamento em Blocos Casualizados, em um arranjo fatorial 4x3, sendo testados quatro touros e três tratamentos de capacitação espermática.

Pré-seleção dos touros

O sêmen de 11 touros da raça Gir foi submetido a análises de viabilidade espermáticas repetidas duas vezes para cada animal, para classificar a qualidade espermática de cada reprodutor. O sêmen foi descongelado em banho-maria a 35°C por 30 segundos e logo após avaliado pelas análises de motilidade e vigor, análise morfológica, concentração espermática e integridade funcional da membrana plasmática avaliada pelo teste hiposmótico (HO). Para garantir uma quantidade satisfatória de sêmen analisada em cada método, duas palhetas de sêmen da mesma partida foram descongeladas.

Dos 11 animais, dois touros superiores e dois inferiores quanto à viabilidade espermática *in vitro* foram selecionados, chamados como A, B, C e D, sendo os touros A e C superiores, B e D inferiores. Diante da impossibilidade de encontrar um ou dois touros com desempenho superior ou inferior em todos os parâmetros e uma vez que para alguns parâmetros como a motilidade muitos touros tiveram igual desempenho, a seleção dos touros foi baseada no parâmetro morfologia. A morfologia, segundo Barth e Oko (1989), possui

relação direta com a fertilidade e também por esta razão foi o parâmetro considerado na seleção dos touros a serem testados.

Análise da reação acrossômica

Foram adicionados os agentes capacitantes aos meios de fertilização, constituindo os tratamentos:

- Tratamento 1 (T1): Heparina - 10µg/mL;
- Tratamento 2 (T2): Teofilina – 5 mM;
- Tratamento 3 (T3): Heparina (10µg/mL) + Teofilina (5mM).

A concentração de 10µg/mL de heparina foi escolhida baseada na rotina de produção da maioria dos laboratórios comerciais de FIV. A concentração de teofilina foi escolhida baseada no estudo de Takahashi e First (1993) que relataram um aumento da capacidade fertilizante dos espermatozoides e do processo de FIV em bovinos com a concentração de 5mM de teofilina. Acredita-se que a associação dos dois agentes melhore a fertilização e diminua a diferença entre os touros, como relatado por Niwa e Ohgoda (1988) com a incubação de espermatozoides na presença de heparina e cafeína.

A integridade do acrossomo foi avaliada empregando-se a técnica de dupla coloração (*trypan blue*/Giemsa – TBG) descrita por Didion *et al.* (1989).

As palhetas de sêmen dos 4 touros foram descongeladas em banho-maria a 35°C por 30 segundos. Uma porção foi depositada em um microtubo tipo Eppendorf sobre o gradiente de Percoll e submetido a centrifugação em microcentrífuga a 700 G durante 10 minutos para se retirar os agentes decapitantes. Uma amostra foi retirada para a avaliação da motilidade e do vigor pós-descongelamento.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e o pellet formado foi ressuscitado com 400 µL de meio Talp Sêmen e levado novamente para a centrifugação a 300 G por 5 minutos. Após esta etapa, o sobrenadante foi novamente retirado e o novo pellet foi ressuscitado com 50 µL de meio Tapl Semen. Uma amostra do ressuscitado foi retirada para a avaliação da motilidade e vigor pós-seleção e da concentração em câmara de Neubauer. Tubos contendo meio de fertilização acrescido dos agentes capacitantes constituindo os tratamentos T1, T2 e T3 foram inseminados com 2×10^6 espermatozoides/mL e levados à incubadora a 38,8°C contendo 5% de CO₂ e umidade saturada, na ausência de oócitos. Uma

amostra foi retirada para se fazer a técnica de coloração pós-descongelamento, sem nenhum agente capacitante.

A técnica de coloração foi aplicada nos seguintes tempos:

- **0h** – Análise da amostra pós-descongelamento sem agente capacitante no momento do descongelamento.
- **6h após incubação** – Análise das amostras dos três tratamentos após 6h de incubação.
- **12h após incubação** – Análise das amostras dos três tratamentos após 12h de incubação.
- **18h após incubação** – Análise das amostras dos três tratamentos após 18h de incubação.

Para se aplicar as colorações, as amostras de sêmen foram incubadas em banho-maria à 37°C durante 15 min contendo a mesma quantidade de *trypan blue* 0,2%. Após incubação, adicionou-se ao tubo ±8 mL de DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*), levando a centrifugação à 700 G durante 6 min até ficar azul claro. O sobrenadante foi retirado após centrifugação. Com o pellet formado foram feitos os esfregaços e secos ao ar. As lâminas foram coradas com solução de Giemsa uso (5%). Após cerca de 60 min as lâminas foram lavadas e secas ao ar.

A análise de reação acrossômica foi feita em duplicata para cada touro e em cada tratamento. As lâminas foram avaliadas em microscópio de campo claro com aumento de 1000x, contando-se 200 células em cada lâmina.

As características avaliadas nas células espermáticas foram:

- *Reação acrossômica verdadeira* - Acrossomo e região pós-acrossomal não coradas;
- *Reação acrossômica falsa* - Acrossomo não corado e região pós-acrossomal corada em azul;
- *Mortos* - Corados em azul pelo *trypan blue* na região pós-acrossomal e acrossomo corado em roxo ou rosa pelo Giemsa.

Obtenção dos ovários

Os ovários de fêmeas bovinas foram obtidos no abatedouro da cidade de Poço Fundo-MG, localizado a 40 km do laboratório de Produção de Embriões. Foram coletados logo após o abate e evisceração, independente da idade, fase do ciclo estral, escore corporal ou estado nutricional dos animais. Os ovários foram acondicionados em garrafa térmica contendo

solução fisiológica (NaCl a 0,9%) a 37-38°C e transportados ao laboratório em um período máximo de duas horas.

Recuperação e seleção dos oócitos

No laboratório, os ovários foram lavados 2 vezes em solução fisiológica (NaCl a 0,9%) previamente aquecida para retirar o sangue impregnado e mantidos a 37°C na mesma solução em banho-maria. Imediatamente após a lavagem, os folículos ovarianos entre 2 a 8 mm de diâmetro foram aspirados utilizando-se seringa de 10 mL acoplada a agulha 40 x 12 mm. O fluido folicular contendo os oócitos foi lentamente depositado na parede do tubo coletor de 15 mL, contendo meio de lavagem TCM-199 HEPES acrescido de soro fetal bovino, piruvato, gentamicina e penicilina. Terminada a punção, os tubos permaneceram em repouso por aproximadamente 15 minutos para decantação. O pellet formado contendo os oócitos foi depositado em placa de petri e seu conteúdo rastreado com auxílio de estereomicroscópio em capela de fluxo laminar, sem a incidência de luz direta. Os oócitos selecionados foram transferidos para outra placa de petri, contendo meio de lavagem TCM-199 HEPES e então classificados morfológicamente de acordo com a qualidade. Apenas os oócitos imaturos classificados como “viáveis”, segundo classificação proposta por Viana *et al.* (2004) foram utilizados no experimento.

Produção *in vitro* de embriões

Após a seleção, os oócitos foram lavados em TCM 199 (HEPES) e em meio de maturação, e transferidos para placas contendo gotas de 100 µL de meio de maturação composto de TCM 199 (Earle), suplementado com 10% de soro fetal bovino, piruvato (22µg/mL), hormônio luteinizante (50µg/mL), hormônio folículo estimulante (0,5µg/mL) e os antibióticos penicilina e gentamicina (50µg/mL de cada) sob óleo mineral (cerca de 20 oócitos por gota). Os oócitos foram maturados a 38,8°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ar e umidade saturada por 24 horas.

Após a maturação, os complexos *cumulus*-oócitos foram lavados em TCM 199 (HEPES) e transferidos para placas de petri, contendo gotas de 90 µL de meio de fecundação suplementado com gentamicina e penicilina (50µg/mL de cada), penicilamina (2,7µg/mL), hipotaurina (1µg/mL), epinefrina (0,3µg/mL), albumina sérica bovina 8806 (5µg/mL) e

piruvato (22 μ g/mL), sob óleo mineral. Na etapa da FIV, também foram adicionados os agentes capacitantes aos meios constituindo os tratamentos T1, T2 e T3.

Para fecundação *in vitro* foram utilizados o sêmen dos 4 touros selecionados. O método de separação dos espermatozoides dos crioprotetores e plasma seminal foi o gradiente de densidade descontínuo de Percoll, preparado previamente com 400 μ L do gradiente 90% e sobre o mesmo 400 μ L do gradiente 45% e mantido em estufa por no mínimo 15 minutos antes de ser utilizado. O sêmen dos 4 touros foi descongelado em banho-maria a 35°C por 30 segundos e uma porção foi depositada em um microtubo tipo Eppendorf sobre o gradiente de Percoll e submetido a centrifugação em microcentrífuga a 700 G durante 10 minutos. Uma amostra foi retirada para a avaliação da motilidade e do vigor pós-descongelamento.

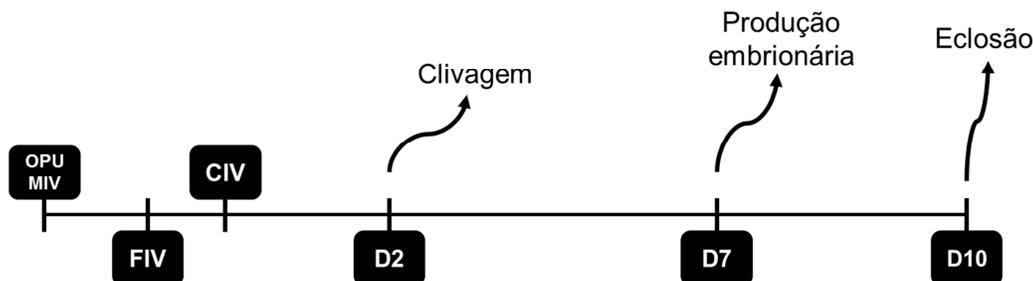
Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado, o pellet formado foi ressuscitado com 400 μ L de meio de fecundação sem nenhum agente capacitante e levado novamente para a centrifugação a 300 G por 5 minutos. Após esta etapa, o sobrenadante foi novamente retirado e o novo pellet foi ressuscitado com 50 μ L de meio de fecundação sem agente capacitante. Uma amostra do ressuscitado foi retirada para a avaliação da motilidade e vigor pós-seleção e da concentração em câmara de Neubauer. A concentração foi ajustada para se obter dose fecundante de 2×10^6 espermatozoides/mL para, posteriormente, se juntar aos oócitos na placa de fertilização. Imediatamente após o processamento, as gotas contendo meio de fecundação (T1, T2 ou T3) e os oócitos receberam o sêmen dos touros. Os oócitos e espermatozoides foram co-cultivados em meio de fecundação por 8 – 18 horas em incubadora a 38,8°C contendo 5% de CO₂ em ar e umidade saturada. O dia da fecundação foi considerado como o dia 0 (D0).

Após o co-cultivo, os oócitos e zigotos foram submetidos à pipetagens para retirada das células do *cumulus oophorus* restantes e espermatozoides aderidos à zona pelúcida com pipeta ajustável calibrada em 100 μ L, em gotas de 200 μ L de meio TCM 199 (Hepes). Após o desnudamento, os possíveis zigotos foram lavados em meio TCM199 (Hepes) e meio de cultivo e transferidos para placas de petri, contendo 80 μ L de meio *synthetic oviductal fluid* (SOF) suplementado com inositol (0,5 μ g/mL) e tricitrato de sódio (0,1 μ g/mL), em incubadora a 38,8°C contendo 5% de CO₂ e umidade saturada.

Após 72 horas de cultivo foram trocados 40 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.

A resposta medida nesta etapa do experimento foi taxa de clivagem, avaliada 48 horas após a fecundação, taxa de produção embrionária avaliada 7 dias após a fecundação e taxa de eclosão avaliada 10 dias após a fecundação.

Figura 2. Esquema da produção *in vitro* de embriões e as taxas avaliadas



Fonte: SILVA, 2014

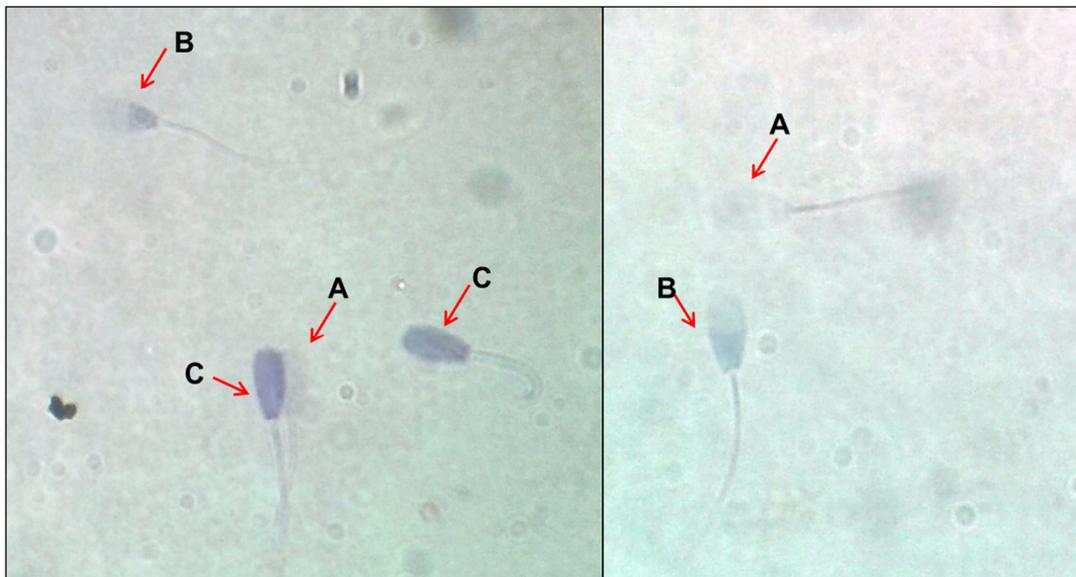
Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando modelos lineares generalizados (PROC GLM). Todas as médias foram comparadas pelo teste Tukey Kramer ($p < 0,05$) utilizando o programa estatístico SAS, versão 9.2 (SAS Institute, USA).

REFERÊNCIAS

- BARTH, A.D.; OKO, R.J. Preparation of sêmen dor morphological examination. In: BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames, Iowa: Iowa State University, 1989, p.8-18.
- DIDION, B.A. *et al.* Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. **Gamete Research**, New York, v.22, n.1, p.51-57, jan.1989.
- NIWA, K; OHGODA, O. Synergistic effect of caffeine and heparin on in-vitro fertilization of cattle oocytes matured in culture. **Theriogenology**, New York, v.30, n.4, p.733-741, oct.1988.
- TAKAHASHI, Y.; FIRST, N.L. In vitro fertilization of bovine oocytes in the presence of theophylline. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.34, n.1, p.1-18, nov.1993.
- VIANA, J.H.M. *et al.* Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.84, n.1-2, p.1-12, ago.2004.

APÊNDICE II

Figura 3. Espermatozoides após coloração *Trypan blue/ Giemsa*

A – Reação acrossômica verdadeira; **B** – Reação acrossômica falsa; **C** – Mortos. FONTE: SILVA, 2014.